TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUERSETİN FİTOZOMLARININ HAZIRLANMASI, *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fatih DELİCE

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ

ANKARA
2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUERSETİN FİTOZOMLARININ HAZIRLANMASI, *İN VİTRO* KARAKTERİZASYONU VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fatih DELİCE

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ

ANKARA
2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Kuersetin Fitozomlarının Hazırlanması, *İn Vitro* Karakterizasyonu ve Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımca yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar kendime aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Fatih DELİCE

Tarih: 13/06/2024

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında

Fatih DELİCE tarafından hazırlanan

"Kuersetin Fitozomlarının Hazırlanması, *İn Vitro* Karakterizasyonu ve Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

13/06/2024

Prof.Dr. Ayşegül KARATAŞ

Ankara Üniversitesi

(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Fahriye Figen TIRNAKSIZ

Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR

Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Kuersetin Fitozomlarının Hazırlanması, *İn Vitro* Karakterizasyonu ve Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında, elma, üzüm, turp gibi bitkisel besinlerde bol miktarda bulunan kuersetin fito-etkili bileşiğinin fitozom formülasyonlarının hazırlanması, karakterizasyonu ve *in vitro* antibakteriyel aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Modern tıptaki gelişmeler günümüz tedavi seçeneklerini de hem geliştirmiş hem de çeşitlendirmiştir. Bu seçenekler arasına geleneksel bitkisel tıbbi ürünlerin de ilave olması ile tedaviler genişletilmiştir. Fito-etkili bileşiklerin düşük biyoyararlanım göstermesi yeni taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyurmuştur. Bunlardan bir tanesi de fitozomal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Kuersetin polifenolik özellikte bir bileşik olup çok çeşitli farmakolojik aktiviteye sahiptir. Son zamanlarda bilim dünyasındaki artan kuersetin ilgisi de yeni formülasyon çalışmalarını hızlandırmıştır.

Fitozomların formülasyonlarının hazırlanmasında, farklı formülasyon hazırlama teknikleri kullanılmaktadır. Formülasyon parametreleri olarak sıcaklık, kuersetin:fosfolipit oranı ve reaksiyon süresi kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır Bu formülasyonları üzerinde enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek seçilen optimum formülasyonun üzerinde *in vitro* karakterizasyon çalışmaları (SEM ve TEM görüntüleme, DSC analizi, FTIR, XRD), çözünürlük, partisyon katsayısı, biyolojik ortamlarda stabilite ile *in vitro* çözünme hızı tayinleri yapılmıştır. Buna ilaveten optimum formülasyonun farklı saklama koşulları altında stabilitesi ve kuersetin içeren fitozomunun saf kuersetin ile karşılaştırmalı olarak antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir.

Kuersetinin fitozom formülasyonunun ilgili literatürler incelendiğinde antibakteriyel aktivitesinin de araştırılmamış olmaması bu tez çalışmasının hedeflediği temeli olmuştur.

Anahtar Sözcükler: Antibakteriyel, fitozom, kuersetin.

SUMMARY

Preparation, *In Vitro* Characterization and Evaluation of Antibacterial Activity of Quercetin Phytosomes

The studies to be carried out within the scope of this thesis; The aim of this study is to prepare the phytosome formulation of quercetin phyto-active compound, which is abundant in plant foods such as apple, grape and radish, and to evaluate the active substance loading efficiency, characterization and *in vitro* antibacterial activity of the related complex.

Advances in modern medicine have both improved and diversified today's treatment options. Treatments have been expanded with the addition of traditional herbal medicinal products among these options. The low bioavailability of phyto-effect compounds necessitated new delivery systems. Quercetin is a polyphenolic plant-derived compound with a wide variety of pharmacological activities. Recently, the increasing interest in quercetin in the scientific world has accelerated the formulation studies.

Different formulation preparation techniques are used in the preparation of phytosomes entrapment efficiency, morphological visualization of the structure, particle size and distribution, zeta potential, thermal analysis and structure analysis, dissolution rate and *in vitro* release determination of phytosome formulations obtained in accordance with will be done. The formulations will be formed by using parameters such as temperature, quercetin:phospholipid ratio and reaction time as formulation parameters. Stability studies of the generated quercetin phytosomes will be determined under different conditions. Antibacterial activity determination of quercetin phytosome and pure quercetin will also be performed.

The fact that the antibacterial activity of the phytosome formulation of quercetin was not investigated when the relevant literature was examined was the basis of this thesis.

Keywords: Antibacterial, Phytosome, Quercetin.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Kabul ve Onay iii
Özet iv
Summary v
İçindekiler vi
Önsöz ix
Simgeler ve Kısaltmalar xi
Şekiller xii
Çizelgeler xiv

1. GİRİŞ 1
1.1. Kuersetin 3
1.2. Kuersetinin Kimyasal ve Molekül yapısı 4
1.3. Kuersetin Fizikokimyasal Özellikleri 5
1.4. Kuersetin Farmakolojik Özellikleri 5
1.5. Kuersetinin Farmakokinetik Özellikleri 7
1.6. Kuersetinin Antibakteriyel Etkisi 10
1.7. Bitkisel Kaynaklı Etkin Maddeler İçin Vezikül Yapılı Bazı Taşıyıcı Sistemler 12
1.8. Fitozom 17
1.9. Fitozom Üretim Teknikleri 20
1.9.1. Dondurarak kurutma veya liyofilizasyon 22
1.9.2. Çözücü buharlaştırma/ince film hidrasyon yöntemi 22
1.9.3. Anti-solvent ile çöktürme yöntemi 22
1.10. Fitozom Yapısının Karakterizasyonu 23
1.11. Fitozom Yapısına Ait Market Çalışmaları 25
1.12. Kuersetin Fitozom Formülasyonlarına Ait Çalışmalar 28
1.13. *İn vitro* Antibakteriyel Çalışmalar 30

2. GEREÇ VE YÖNTEM 33
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler 33
2.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler 34
2.3. Yapılan Çalışmalarda Kullanılmış Ortamlar ve Hazırlanışı 34
2.4. Kuersetinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 36
2.4.1. Kuersetinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrum Ölçülmesi 36
2.4.2. Kuersetin Ultraviyole (UV) Analizi 36
2.4.3. Kuersetinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi 37
2.4.4. Kuersetinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi 37
2.4.5. Kuersetinin X-Ray Difraksiyonu (XRD) Analizi 37
2.5. Kuersetin için Miktar Tayini Çalışmaları 37
2.6. Kuersetinin Miktar Tayini Çalışmalarının Analitik Validasyonu 38
2.6.1. Doğrusallık ve Aralığı 38
2.6.2. Doğruluk ve Geri Elde 38
2.6.3. Kesinlik 39
2.6.3.1. Tekrarlanabilirlik 39
2.6.3.2. Ara Kesinlik 39
2.6.4. Özgünlük (Seçicilik) 40
2.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırları (LOQ) Belirlenmesi 40

2.7. Kuersetin için Çözünürlük Deneyleri Çalışmaları 41
2.8. Kuersetin için Partisyon Katsayısı Çalışmaları 41
2.9. Kuersetin Fitozom için Yapılan Formülasyon Çalışmaları 42
2.10. Hazırlanan Formülasyonlara Ait *İn Vitro* Karakterizasyon Çalışmaları 46
2.10.1. Enkapsülasyon Etkinlik Tayini 46
2.10.2. Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite Tayinleri 46
2.10.3. Zeta Potansiyeli Tayini 46
2.11. Optimum Formülasyonun Belirlenmesi 47
2.12. Optimum Formülasyona ait Karakterizasyon Çalışmaları 47
2.12.1. Optimum Formülasyona ait Çözünürlük Tayini 47
2.12.2. Optimum Formülasyona ait Partisyon Katsayısı Tayini 48
2.12.3. Optimum Formülasyona ait DSC Termogram Grafikleri 48
2.12.4. Optimum Formülasyona ait FTIR Analizleri 48
2.12.5. Optimum Formülasyona Ait XRD Analizi 48
2.12.6. Optimum Formülasyona ait TEM Görüntüleri 49
2.12.7. Optimum Formülasyona ait Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta potansiyeli Tayini 49
2.12.8. Optimum Formülasyona ait *İn Vitro* Salım Çözünme hızı Çalışmaları 49
2.12.9. Etkin Madde İçin Formülasyondan Salım Kinetik Modellerinin Değerlendirilmesi 50
2.13. Stabilite Çalışmaları 50
2.13.1. Optimum Formüle ait Simüle Mide (SGF) ve Simüle Bağırsak (SIF) Ortamlarındaki Stabilite Çalışmaları 51
2.13.2. Oda Sıcaklığı ve Buzdolabı Ortamlarındaki Stabilite Çalışmaları 51
2.14. Kuersetin ve Optimum Formülasyon İçin Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları 52

3. BULGULAR 54
3.1. Kuersetine ait Fizikokimyasal Özellikler 54
3.1.1. Kuersetine Ait FTIR Analizine ait Bulgular 54
3.1.2. Kuersetine ait UV Analizine ait Bulgular 54
3.1.3. Kuersetinin DSC Analizine ait Bulgular 55
3.1.4. Kuersetinin SEM Analizine ait Bulgular 55
3.1.5. Kuersetinin XRD Analizine ait Bulgular 56
3.2. Kuersetinin Miktar Tayini Çalışmaları 56
3.2.1. Kuersetinin Kalibrasyon Doğru Grafiklerinin Oluşturulması 56
3.2.2. Kuersetinin Analitik Validasyonuna ait Bulgular 58
3.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı 58
3.2.2.2. Doğruluk ve Geri elde 59
3.2.2.3. Kesinlik 61
3.2.2.4. Özgünlük 63
3.2.2.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırları (LOQ) Belirlenmesi 64
3.3. Kuersetin Çözünürlük Çalışmalarına ait Bulgular 64
3.4. Kuersetin Partisyon Katsayısı Çalışmalarına ait Bulgular 65
3.5. Kuersetinin Formülasyon Çalışmalarına ait Bulgular 65
3.6. Optimum Formülasyonun Belirlenmesi 68
3.7. Optimum Formülasyona ait Karakterizasyon çalışmaları 68
3.7.1. Optimum Formülasyona ait Çözünürlük Çalışmalarına ait Bulgular 68
3.7.2. Optimum Formülasyona ait Partisyon Katsayısı Çalışmalarına ait Bulgular 70
3.7.3. Optimum Formülasyona ait DSC termogramları 70
3.7.4. Optimum Formülasyona ait FTIR Analizleri 71
3.7.5. Optimum Formülasyona ait XRD Analizi 72
3.7.6. Optimum Formülasyona ait TEM Görüntüleri 72

3.7.7. Optimum Formülasyona ait *İn Vitro* Salım Çözünme hızı Çalışmalarına ait Bulgular 73
3.7.8. Optimum Formülasyona ait Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi 73
3.8. Optimum Formülasyona ait Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular 76
3.8.1. Optimum Formülasyona ait Simule Mide ve Bağırsak ortamlarındaki Stabilitelerine ait Bulgular 76
3.8.2. Optimum Formülasyona ait Buzdolabı ve Oda Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular 77
3.9. Kuersetin ve Optimum Formülasyon için Antibakteriyel Çalışmalar 77

4. TARTIŞMA 79
4.1. Kuersetinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi 79
4.1.1. Kuersetinin FTIR Analizlerinin Değerlendirilmesi 79
4.1.2. Kuersetinin UV Analizlerinin Değerlendirilmesi 79
4.1.3. Kuersetinin DSC Analizlerinin Değerlendirilmesi 79
4.1.4. Kuersetinin SEM Görüntülerinin Değerlendirimesi 80
4.1.5. Kuersetinin XRD Analizlerinin Değerlendirilmesi 80
4.2. Kuersetin Miktar Tayini Analizleri ve Analitik Validasyonlarının Değerlendirilmesi 80
4.3. Formülasyon Çalışmaları Kapsamında Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi 82
4.4. Optimum Formülasyon Kapsamında Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi 83
4.4.1. Optimum Formül için Çözünürlük Çalışmalarının Değerlendirilmesi 83
4.4.2. Optimum Formül için Partisyon Katsayısı Çalışmalarının Değerlendirilmesi 84
4.4.3. Optimum Formülasyon için *İn vitro* Salım Çözünme Hızı Çalışmalarının Değerlendirmeleri 84
4.4.4. Optimum Formülasyon için Salım Kinetikleri Değerlendirmeleri 86
4.4.5. Optimum Formülasyon için TEM Görüntülemelerinin Değerlendirilmesi 86
4.4.6. Optimum Formülasyon için DSC Analizinin Değerlendirilmesi 87
4.4.7. Optimum Formülasyon için FTIR Analizinin Değerlendirilmesi 88
4.4.8. Optimum Formülasyon için XRD Analizinin Değerlendirilmesi 88
4.4.9. Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi 89
4.4.9.1. Optimum Formüle ait Simule Mide ve Simüle Bağırsak Ortamlarındaki Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi 89
4.4.9.2. Oda Sıcaklığı ve Buzdolabı Ortamındaki Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi 90
4.5. Kuersetin ve Optimum Formülasyon için Antibakteriyel Çalışmalar 91

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 93
KAYNAKLAR 95
ÖZGEÇMİŞ 108

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmaları kapsamında çok çeşitli farmakolojik aktivitesi kanıtlanmış olan kuersetin fito-aktif bileşiğinin fitozom formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan fitozom yapılarının *in vitro* karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Optimum formülasyona ait çeşitli bakteri türlerinde antibakteriyel çalışmalar değerlendirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konudaki desteğini esirgemeyen; tüm tez çalışma sürecimin oluşturulması, yürütülmesi ve yönetilmesi, çok fedakâr koşullar altında tez çalışmalarıma devam etmem konusundaki ısrarı, ayrıca yol göstericiliği ile sonsuz saygı duyduğum bir ömür minnet duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşegül Karataş'a teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarımın devamlılığı konusunda gösterdiği hassasiyet sayesinde sürecin tamamlanmasında çok fazla emeği bulunan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL'e teşekkürlerimi iletirim.

Yüksek lisans eğitimimin ilk gününden bugünlere gelmemde katkıda bulunan, akademik ve mesleki olarak bana katkı sağlayan, her türlü tecrübelerini paylaşan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyelerine ve öğretim elemanlarına teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden başlayarak eczacılık mesleğinde yol kat etmemi sağlayan ve ısrarla beni hep destekleyen tüm Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim elemanlarına sonsuz teşekkürü bir borç bilir ve saygılarımı sunarım.

İlk çalışma görev yerim olan ve bana çok fazla katkıda bulunan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Kırıkhan Meslek Yüksekokulu öğretim elemanlarına ve Eczane Hizmetleri Programı'nda beraber yol aldığım sayın meslektaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi iletirim. 6 Şubat 2023 tarihinde meydana gelen depremde hayatlarını kaybeden herkese rahmet dilerim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca tecrübelerinden fazlaca faydalandığım, desteklerini hep hissettiğim başta Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi Dekanı sayın Prof. Dr. Mehmet AKYÜZ olmak üzere, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nin değerli öğretim üyelerine ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Zonguldak'taki akademik hayatıma katkıda bulunan Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve beni sürece hep motive eden Sayın Dr. Öğr. Üy. Aysun ÇELİK SOYSAL'a, Arş. Gör. Dr. Burcu Timur'a ve Arş. Gör. Dr. Birnur ÇÖMEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimdeki zorlu koşullarda beni sürekli ayakta tutmak için çabalayan ve yol gösteren hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ayrıca güler yüzü ile çalışmalarımda hep yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Üy. Aslıhan Hilal ALGAN'a teşekkürlerimi iletirim. Yine bu zorlu süreçte beni destekleyen akademik olarak gelişmemde katkıda bulunan Sayın Dr. Ecz. Ayça GÜNGÖR AK'a teşekkürlerimi iletirim.

Tüm tez çalışmalarımda hep bir telefon uzağımda olan değerli meslektaşlarım Sayın Ecz. Semra DURAK, Ecz. Büşra GELMEZ, Ecz. Ayşenur BÜKE, Ecz. Ayşenur BEZELYA, Ecz. Ömer YEDİKAYA'ya Öğr. Gör. Nebahat DURMAZ'a tecrübelerini aktardığı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eczacılık mesleğine ilk adım attığım andan her türlü arkadaşlık konusunda beni destekleyen Ecz. Ezgi UÇAR, Ecz. Abdullah Esved SARI, Ecz. Zeynel Abidin DORUK, Ecz. Serap CEYHAN, Ecz. Süleyman ÇETİN' e teşekkürlerimi iletirim.

İn vitro çalışmalar kapsamında mikrobiyolojik çalışmalara katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Nurten ALTANLAR'a ve Arş. Gör. Murat Sefa KARAASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SEM ve TEM analizleri için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Merkezi laboratuvar çalışanlarına ve DSC, FTIR çalışmalarıma katkıda bulunduğu için Ankara Üniversitesi çalışanlarına teşekkürlerimi iletirim. XRD çalışmalarım için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi ARTMER birimine teşekkür ederim.

Bu sürecin en başından beri bana destek olan annem Şerife DELİCE'ye, babam Ali DELİCE'ye, ablam Merve YİĞİT'e, eniştem Ramazan YİĞİT'e ve beni koşulsuz sevdikleri için hep mutlu olduğum sevgili yeğenlerim Zeyneb ve Hafsa'ya da sonsuz teşekkürlerimi

iletiyorum. Sizleri çok seviyorum. Bu çalışmaların bir diğer destekleyicisi de benim için hep sizlerdiniz. İyi ki varsınız. Hep yanımda olun.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
θ	Thita
Ade*B*	Acinetobacter İlaç Çıkışı beta
ADME	Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	Beta Hücreli Lenfoma-2
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
bla_{NDM}	Beta Laktamaz Yeni Delhi Metallo
CL/F	Klirens/Biyoyararlanım oranı
CO_2	Karbondioksit
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FDA	Amerika Gıda ve İalç Dairesi
GİS	Gastrointestinal Sistem
GyrB	Giraz Subünite B Protein
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
NF-B	Non-Fermentatif Gram Negatif Bakteri
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
SCI	Spinal Kort Yaralanmaları
TGA	Termogravimetrik Analiz
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü alfa
UPLC	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
YİTS	Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Lipozom ve fitozom yapılarının karşılaştırmalı şekilleri 3
Şekil 1.2. Kuersetin halkalı yapısı 4
Şekil 1.3. Kuersetin farmakolojik etkilerinin gösterimi 7
Şekil 1.4. Kuersetin metabolitleri 9
Şekil 1.5. Kuersetin farmakokinetik özellikleri 10
Şekil 1.6. Kuersetin antibakteriyel etki mekanizmaları 11
Şekil 1.7. Taşıyıcı sistemlerden çeşitli örnekler 14
Şekil 1.8. Kompleks yapının şekil gösterimi 17
Şekil 1.9. Komplekleşme mekanizması 17
Şekil 1.10. Fitozom yapısı 18
Şekil 1.11. PC'nin kimyasal yapısı 18
Şekil 1.12. Fitozom yapısının hücre içine girişi 20
Şekil 1.13. Fitozom üretim tekniklerinin şematik gösterimi 23
Şekil 1.14. Mikro dilüsyon yöntemi 32
Şekil 2.1. Su ceketi sistemi örneği 42
Şekil 2.2. Rotary evaporatorde gerçekleştirilen ince film yöntemi ile fitozom hazırlamanın gösterimi 43
Şekil 2.3. Kuersetin mikroplak çalışması 52
Şekil 2.4. Kuersetin fitozom mikroplak çalışması 53
Şekil 3.1. Kuersetin FTIR spektrumları 54
Şekil 3.2. Kuersetin UV spektrumu 55
Şekil 3.3. Kuersetine ait DSC termogramı 55
Şekil 3.4. Kuersetine ait SEM görüntüleri 56
Şekil 3.5. Kuersetin XRD grafiği 56
Şekil 3.6. pH 1,2 tamponu kalibrasyon grafiği 57
Şekil 3.7. pH 6,8 tamponu kalibrasyon grafiği 57
Şekil 3.8. %0,2'lik Tween 80 pH 6,8 tamponu 57
Şekil 3.9. %0,2 Tween 80'li pH 6,8 doğrusallık grafiği 58
Şekil 3.10. pH 6,8 tamponu doğrusallık grafiği 59
Şekil 3.11. 25°C ve 37°C pH 1,2 çalışmalarına ait çözünürlük-zaman grafiği 64
Şekil 3.12. 25°C ve 37°C pH 6,8 çalışmalarına ait çözünürlük-zaman grafiği 65
Şekil 3.13. Tekrarlanabilirlik çalışması kapsamında partikül boyutu dağılımı gösterimi 67

Şekil 3.14. Formülasyonlara ait salım çalışmaları 68
Şekil 3.15. 37°C'deki pH 1,2 için kuersetin ve F-17 formülünün çözünürlük grafiği 69
Şekil 3.16. 37°C'deki pH 6,8 için optimum formülün çözünürlük çalışması 69
Şekil 3.17. DSC termogramları a)Formülasyon b)Kuersetin c) Fosfotidilkolin d)Fiziksel karışım 70
Şekil 3.18. Fosfotidilkolin FTIR analizi 71
Şekil 3.19. Formülasyon FTIR analizi 71
Şekil 3.20. Optimum formül karşılaştırmalı XRD analizleri kırmızı kuersetin, mavi fosfotidilkolin, mor fiziksel karışım, siyah optimum formül 72
Şekil 3.21. Optimum formül TEM görüntüleri 72
Şekil 3.22. *İn vitro* salım çalışmaları 74
Şekil 3.23. Simule Gastrointestinal Sıvılarda Bozunmadan Kalan % Kuersetin Miktarı 76

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Farklı taşıyıcı sistemlere ait karakteristik özellikler 16
Çizelge 1.2. Fitozom üretim teknikleri 21
Çizelge 1.3. Fitozomların karakterizasyonu için kullanılan analitik yöntemler (Barani vd., 2021b) 24
Çizelge 1.4. Fitozom yapılarına ait bazı piyasa ürünleri 26
Çizelge 1.5. Fitozom yapılarına ait klinik çalışmalar 27
Çizelge 2.1. Formülasyon ön çalışmaları 44
Çizelge 2.2. Formülasyon çalışmaları 45
Çizelge 2.3. Stabilite koşulları (ICH Q1A) 50
Çizelge 3.1. Çalışılan ortamların doğrusallık istatistikleri 59
Çizelge 3.2. %0,2 Tween 80 pH 6,8 'li ortam doğruluk analizleri 60
Çizelge 3.3. pH 6,8 tamponu doğruluk analizleri 60
Çizelge 3.4. %0,2 Tween 80'li pH 6,8 tekrarlanabilirlik analizleri 61
Çizelge 3.5. pH 6,8 tamponu tekrarlanabilirlik analizleri 62
Çizelge 3.6. Ara kesinlik analizleri 63
Çizelge 3.7. Teşhis ve tayin sınırı analizleri 64
Çizelge 3.8. Formülasyonlar çizelgesi (n=3) (Ortalama±SS) 66
Çizelge 3.9. Formülasyonların üretim tekrarlanabilirlik analizleri(Ortalama±SS) 67
Çizelge 3.10. Partisyon katsayısı değerleri 70
Çizelge 3.11. Salım kinetik değerleri 75
Çizelge 3.12. *S*imule Gastrointestinal Sıvılardaki Bozunmadan Kalan Kuersetin Konsantrasyonları 76
Çizelge 3.13. Oda ve Buzdolabı Stabilite Bulgularının Sonuçları (Ortalama±SS) 77
Çizelge 3.14. *İn vitro* antibakteriyel çalışmalara ait MİK değeri sonuçları 78

1. GİRİŞ

İnsan medeniyeti, bilinen geçmiş çağlardan beri çeşitli rahatsızlıkların tedavisi, kontrolü ve yönetimi için bitkisel ilaçları sıklıkla kullanmıştır. Bitkisel ilaçlarla ilgili en eski yazılı çalışmalar Çin'de keşfedilmiştir. M.Ö. 2800'lü yıllara kadar uzanan bu belgeler incelenmiş ve antik uygarlıklardan kalan arkeolojik kalıntılar, bitkilerin cenaze törenlerinde, diğer toplu ritüellerde kullanıldığını ortaya çıkarmıştır. Bitkisel ilaçların kullanımına dair fiziksel kanıtlar 60.000 yıl öncesine, 1960 yılında Mezopotamya bölgesinde ortaya çıkarılan Neandertal insan mezarına kadar uzanmaktadır. Toprak üzerinde yapılan bir analizde, mezarda bitki polenleri olduğunu ve bunların günümüzde de kullanılan tıbbi bitkiler olduğunu ortaya koymuştur (A. Sharma vd., 2021).

Geleneksel bitkisel tedavilerde birçok reçete kullanılmaktadır ve bunlar daha az yan etkili olacak ve daha iyi etki gösterecek şekilde allopatik seçenekler sunacak koşullarla beraber güncellenmeye devam etmektedir. Bitkisel tedaviler, modern ilaç tedavileri gibi güvenli gözükse de yan etkilerinden veya risklerinden tamamen uzaklaşmak mümkün değildir. Bitkisel tedaviler için de yan etki ve güvenlik profil çalışmaları, doz çalışmaları, idiosenkratik ve alerjik reaksiyon çalışmaları halen devam etmekte olup ilgili farmakovijilans sistemlerine kayıt edilmektedir (Choudhury vd., 2023; De Smet, 2004).

Günümüzde kullanılmakta olan birçok ilaç molekülü bitkilerden köken almaktadır. Hatta Amerika Birleşik Devletleri'nde reçete edilmekte olan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kaynaklı en az bir etkin madde içermektedir. Bu ürünlerin bazıları doğrudan bitkisel kaynaklı iken bazıları da bitkileri ürünleri kaynak alarak kimyasal olarak sentezlenmektedir. Biyolojik aktiviteye sahip çeşitli bitkilerin araştırılması halen devam etmektedir. DSÖ raporuna göre, dünya nüfusunun yaklaşık % 80'i bitkilerden köken alan ilaçlara güvenmektedir (Chandira ve Jayakar, 2010).

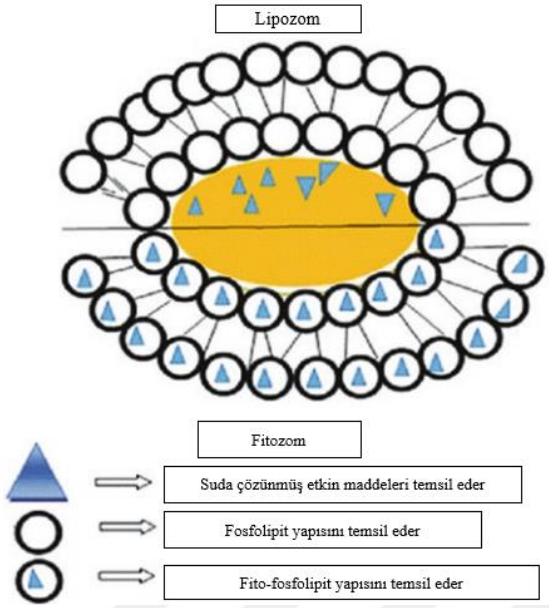
Bu çalışmalar sayesinde ilaç endüstrisine katkıda bulunulmaktadır. 1981-2006 yılları arasında onaylanan ilaçların yaklaşık olarak yarısı doğrudan veya dolaylı olarak doğal kaynaklı ürünlerden geliştirilmiştir (Bonifácio vd., 2013). Fitokimyasal ve fitofarmakolojik çalışmalar, çeşitli bitkisel kaynaklı ürünlerin geniş kapsamlı olarak yaklaşıldığında insan sağlığı üzerindeki olumlu etkisini uzun sürelerdir ortaya koymaktadır, ancak bu ürünlerin yağdaki düşük çözünürlükleri ve zayıf biyoyararlanım göstermelerinden dolayı bu

özelliklerinin geliştirilmesi için çaba harcanmaktadır ve fizyolojik sebeplere bağlı olarak buna ihtiyaç duyulmaktadır (Manach vd., 2004).

Bitkisel ilaçlar, ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi sayesinde daha etkili terapötik potansiyele ulaşmıştır. Lipit çözünürlüğü ve moleküler boyut, ilaç moleküllerinin oral veya topikal uygulamayı takiben sistematik olarak absorbe edilmek üzere biyolojik membrandan geçmesini sınırlayan başlıca faktörlerdir. Çeşitli bitki ekstraktları ve bitkisel kaynaklı bileşikler, *in vitro* olarak mükemmel biyolojik aktiviteye sahip olmalarına rağmen, zayıf lipit çözünürlükleri veya uygun olmayan moleküler büyüklükleri ya da her ikisi nedeniyle daha az *in vivo* etki gösterirler veya hiç gösteremezler. Bu bitkisel kaynaklı bileşiklerin zayıf emilimi bu iki özellikten kaynaklanmaktadır (Mohapatra vd., 2021).

Başlıca sebep olarak bitkisel kaynaklı polifenolik yapılı bileşikler için çok halkalı yapıda olmaları, pasif difüzyon veya aktif taşıma ile absorbe edilemeyecek kadar büyük olması zayıf emilimi etkileyen nedenlerden biridir. İkincil bir neden olarak ise, bu bileşiklerin zayıf su veya yağdaki çözünürlüğü, gastrointestinal sistemdeki hücrelerden geçmelerini engeller (Lu vd., 2019). Bu da zayıf emilim ve zayıf biyoyararlanımla sonuçlanmaktadır (Ajazuddin ve Saraf, 2010).

Çeşitli kaynaklarda "herbozom" olarak da adlandırılan fitozom yapısı, sırasıyla bitki ve hücre benzeri yapı anlamına gelen "fito" ve "zom" terimlerini birleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Fitozomlar, lipozom yapısına çok benzemektedirler (Şekil 1.1). Veziküler ilaç taşıyıcı sistemi olarak bilinen fitozomlar, fito-aktif moleküllerin biyoyararlanımlarını ve absorpsiyonlarını iyileştirmek ve bitki ekstratlarının olumsuz etkilerini önlemek için bitki özlerinin veya hidrofilik fitokimyasalların fosfolipitlere dâhil edilmesiyle oluşmaktadır (Bombardelli, E., Curri, S.B., Loggia, R.D., Negro, P.D., Gariboldi, P., ve Tubaro, 1989; Karataş ve Turhan, 2015; Karpuz vd., 2020).



Şekil 1.1. Lipozom ve fitozom yapılarının karşılaştırmalı şekilleri (S. Sharma, 2020)

Kuersetin, doğal olarak oluşan polifenoller olan flavonoitler sınıfına aittir (Dai vd., 2024). Kuersetin adı, 1857'de Quercus'un adını taşıyan Quercetum'dan (meşe ormanı) türetilmiştir.

Kuersetin, acı tadı olan sarı bir katı tozdur; alkolde belirli bir oranda çözünür, ancak hidrofobik yapıda olduğu için suda pratik olarak neredeyse çözünmez (Agarwal vd., 2023). Kuersetin polifenol gruplarına sahip olan ve kapari, incir, kızılcık, kırmızı soğan, turp yaprağı, kuşkonmaz, brokoli, ceviz ve kişniş dahil olmak üzere birçok sebze ve meyvede yüksek miktarlarda bulunan, farmakolojik aktivitesi kanıtlanmış flavonoit yapıda bir bileşiktir (Khursheed vd., 2020).

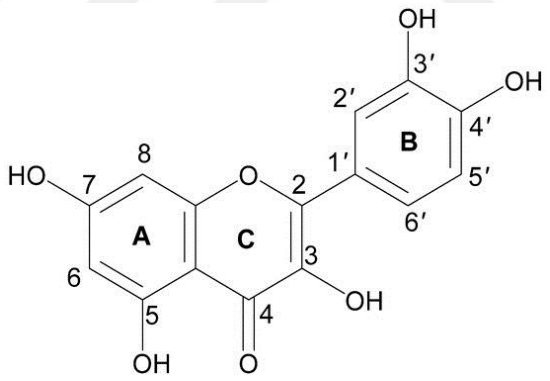
1.1. Kuersetin

Besin kaynakları arasında yaygın olarak bulunması ve toplam flavonol alımının yaklaşık %75'ini oluşturması sayesinde son yıllarda, kuersetin üzerinde büyük bir ilgi meydana getirmiştir. Kuersetin esas olarak meyvelerde veya meyve kabuklarında bulunur ayrıca meyve ve sebzelere karakteristik renkler sağlamasıyla bilinir (Xiao vd., 2018). Sebzeler, meyveler ve kabuklu yemişler çoğunlukla kuersetin glikozitleri (şekere konjuge edilmiş kuersetin aglikonu) içerir (Guo ve Bruno, 2015; Zaplatic vd., 2019)

Kuersetin *Hypericum perforatum, Ginkgo biloba, Allium cepa, Centella asiatica* gibi yirmiden fazla çeşitli farklı bitki türlerinde bulunmaktadır. Ayrıca kuersetinin bazı bitkisel ürünlerin 100 gramlarındaki miktarları incelendiğinde soğanda 13,27 mg, ıspanakta 4,28 mg, elmada 4,42 mg, brokolide ise 3,21 mg gibi düşük miktarlarda var olduğu belirlenmiştir (Rajesh R ve Dhanaraj, 2023). Son zamanlarda, kuersetine FDA tarafından GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan) statüsü de verilmiştir (de Barros vd., 2022).

Kuersetin bitkisel kaynaklı olmasından dolayı farklı bölgelerdeki günlük tüketim değerleri ve kuersetinin piyasaya sunulan ürün çeşitliliği ve dozaj şekilleri de farklılık göstermektedir. Geniş farmakolojik aktiviteleri sayesinde kuersetin, toz ve kapsül formunda bir besin takviyesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Birçok ülke meyve, sebze ve çay tüketimine göre günde 50 ile 800 mg arasında değişen farklı günlük tüketimleri bildirmiştir (Azeem vd., 2023). Raporlara göre, ABD, İspanya, Japonya ve Çin gibi ülkelerde günlük ortalama kuersetin tüketimi sırasıyla 9.75 mg, 18.48 mg, 16.2 mg ve 18 mg'dır (Aghababaei ve Hadidi, 2023).

1.2. Kuersetinin Kimyasal ve Molekül yapısı



Şekil 1.2. Kuersetin halkalı yapısı (Ansari vd., 2022)

Kuersetin, heterosiklik bir piron halkası ile bağlanmış iki benzen halkasından oluşur. Kuersetinin IUPAC adlandırılması 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidrokromen-4-on'dur (Şekil 1.2). Kuersetin 3, 3', 5, 7 ve 4' pozisyonlarında toplam beş tane hidroksil grubundan oluşur. Kuersetin bir aglikondur ve 3 pozisyonunda bir glikozil grubunun eklenmesi, -OH grubunun değiştirilmesi, kuersetin glikozitinin oluşmasına yol açar. Kuersetin, lipit yapılarında ve polialkollerde yüksek oranda çözünür ancak suda neredeyse hiç çözünmez. Glikozit grubu suda çözünürlüğünü artırdığı için kuersetin glikoziti belirli oranda suda çözünür (Li vd., 2016). Ayrıca yağılan çeşitli çalışmalarda, A ve B halkalarının 3, 5, 7, 3' ve

4' pozisyonlarında bulunan hidroksil gruplarının, ikinci ve üçüncü karbonlar arasındaki çift bağın ve dördüncü karbondaki karbonil grubunun kuersetinin önemli biyolojik aktivitelerinden biri olan antioksidan özelliğinde büyük bir paya sahip olduğunu göstermektedir (Ozgen vd., 2016; Wadhwa vd., 2022).

1.3. Kuersetin Fizikokimyasal Özellikleri

Kuersetinin molekül ağırlığı 302,2 g/mol olup kapalı formülü ise $C_{15}H_{10}O_7$' dir (Hatahet vd., 2016). Kuersetin, etil asetat/pentan karışımında 195 °C'de sarı iğneler halinde görünür. Hem dihidrat hem de susuz formlarda bulunur. Susuz kuersetinin sudaki çözünürlüğü 25 °C'de 0,00215 g/L ile 140 °C'de 0,665 g/L arasında ve kuersetin dihidratın 25 °C'de 0,00263 g/L ile 140 °C'de 1,49 g/L aralığında değişkenlik gösterir. Kuersetin dihidratın sulu çözünürlüğü 80 °C'ye kadar susuz formdakine neredeyse benzerdir (Srinivas vd., 2010). Ayrıca yapılan çalışmalarda partisyon katsayısı değerinin 1,82±0,3 olduğu bulunmuştur (Rothwell vd., 2005).

Kuersetin için fizikokimyasal özellikleri olarak değerlendirildiğinde önemli problemlerden birisi fotostabilitesinin düşük olmasıdır. Bir diğer problem ise farklı pH değerlerindeki kararsız olma durumudur. Yapılan çeşitli araştırmalarda zayıf bazik ortam olan pH 8 içinde neredeyse bozunurken; pH 5'te ise kuersetinin yaklaşık olarak %75'inin bozulmadan kaldığı görülmüştür. Bu koşullar altında kuersetin protik ortam koşullarında daha stabil bir profil sergilemiştir (Pinheiro vd., 2021).

1.4. Kuersetin Farmakolojik Özellikleri

Kuersetin, genel sağlık durumunun iyileştirilmesi, fiziksel ve zihinsel aktivitenin arttırılması ve çeşitli farklı farmakolojik etkileri içeren, farmakolojik etkileri iyi bilinen ve biyolojik etkilere sahip, geniş bir aktivite alanına sahiptir (D'Andrea, 2015). Kuersetinin çeşitli farmakolojik etkileri de Şekil 1.3 üzerinde gösterilmiştir.

Kuersetin için yapılan farklı araştırmalar çeşitli kanser türleri, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif rahatsızlıklar, enfeksiyona bağlı durumlar, immünolojik yetersizlikler ve çeşitli metabolik kaynaklı hastalıklar gibi meydana gelebilen patolojik durumların önlenmesinde de etkili olabileceğini öne sürmektedir (Fideles vd., 2023; Shabbir vd., 2021).

Kanser oldukça yaygın ve ölümcül bir hastalıktır (Selvaraj ve Venkidasamy, 2024). Çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılan araştırmalar, kuersetin için hücre apoptozunu öncülük etmede, metastazı önlemede ve hücre döngüsü mekanizmasının kontrol edilmesinde rolünün olabileceğini göstermiştir. Tümör anjiyogenezini düzenleme özelliği ile de güçlü bir antikanser role sahip olduğu kanıtlanmıştır. Kuersetin, anti-kanser etki göstermesini göstermek ve tümör hücrelerinin kemoterapiye olan duyarlılığını artırmak için miRNA ekspresyonunu ve DNA metilasyon seviyesini doğrudan etkileyen epigenetiği düzenleyerek tümör gelişimini değiştirebilmektedir. Klinik çalışmaların gelişmesiyle birlikte, kuersetinin kanser tedavisi için büyük potansiyeli olduğu doğrulanmıştır (Tang vd., 2020).

Kuersetin, sinir dokusu üzerinde nöroprotektif özelliklere sahiptir ve biyolojik aktiviteye sahip flavonollerin alt grubundan kabul edilen flavonoitidir. SCI veya siyatik sinir yaralanmaları olan hayvan modellerinin gösterimlerinde, kuersetin uygulanması sonucunda histopatolojik hasarı, enflamatuar sitokin sentezini ve hücresel oksidatif stresi azaltarak nörofizyolojik fonksiyonların ve lokomotor kapasitenin önemli ölçüde iyileşmesini sağladığı gösterilmiştir. Halen klinik olarak araştırma eksikliği olmasına rağmen, *in vivo* çalışmalar kuersetinin sinir sistemi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceğini, zararlı değişiklikleri en aza indirme, rejenerasyonu destekleme ve nörolojik fonksiyonların iyileşmesini artırma gibi potansiyelinin olduğunu göstermiştir (Fideles vd., 2023).

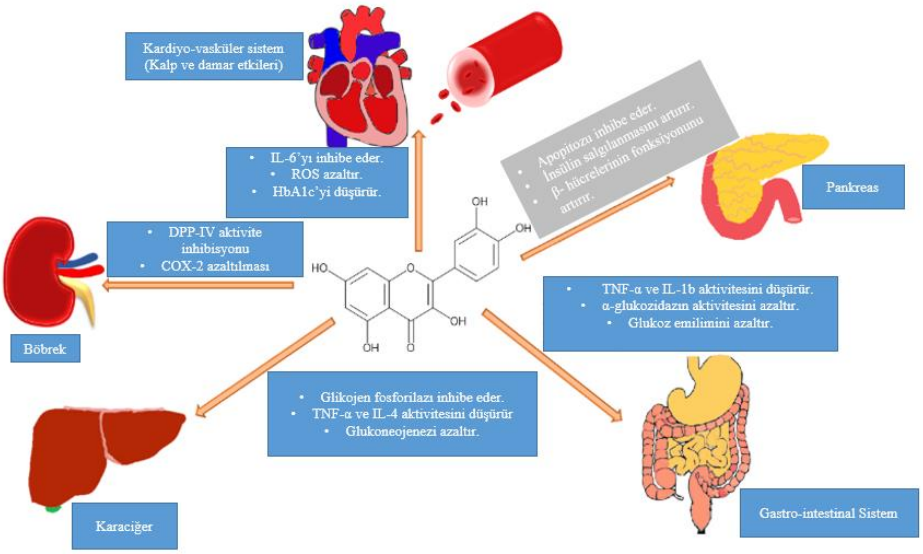
Kuersetin, LDL oksidasyonun inhibisyonunu destekler, damar endotel yapısından bağımsız olarak damarlar üzerinde vazodilatör etkilidir. Adezyon molekülleri ve diğer enflamatuar belirteçlerin azaltılmasında katkıda bulunur. Oksidatif stres koşulları altında nitrik oksit ve endotel fonksiyonu üzerinde koruyucu etki göstermektedir. İnflamatuar hasar ve trombositlerin antiagregan etkileri, nöronal oksidatif stresin önlenmesi gibi kalp üzerinde önemli faydaları bulunmaktadır (R. V. Patel vd., 2018).

Dünya çapında en yaygın metabolik bozukluk olan Tip 2 diyabet, değişen derecelerde oksidatif stres, pankreatik β hücre disfonksiyonu ve insülin direnci ile oldukça çeşitlilik gösteren bir yapıya sahiptir. Hiperglisemik koşullarda artan yağ asidi metabolizması ve glikoz oto-oksidasyonu, aşırı hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Kuersetin, diyabetin birden fazla hedefi üzerinde etkili olan ve temel sinyal yollarını düzenleyen bir doğal bileşiktir. Şu anda kullanılan farmasötik ürünlerin aksine, hem hiperglisemiyi hem de bununla ilişkili makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonları iyileştirir. Kuersetin insülin salgılanmasını uyarır, pankreatik β hücrelerini ROS'tan korur ve

hücrelerin antioksidan savunma durumunu iyileştirir. Ayrıca, kuersetin ticari olarak mevcut antidiyabetik ilaçlardan daha iyi bir güvenlik profiline sahiptir (Dhanya, 2022).

Kuersetin çeşitli farmakolojik etkilere sahip olmasına ilave olarak diğer farmakolojik etkilere sahip bileşiklerle de sinerjistik etkileşime girmektedir. Bu nedenle, kuersetin üzerine araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar sayesinde kuersetinin *in vivo* deney çalışmaları üzerine ilgi artmış ve gelecek çalışmalara öncül olacaktır (H. Zou vd., 2021). Ayrıca çeşitli çalışmalarda kuersetinin günlük nutrasötik olarak kullanılmasına bağlı kullanımın 1g/gün miktarına kadar izin verilebildiğini göstermektedir. Ancak bunun % 60'ının emilimi mevcut olduğu gösterilmiştir (Deepika; Maurya, 2022; Shafabakhsh ve Asemi, 2019).

% 0-50 arasında emilimi olduğunu gösteren araştırmalar da mevcuttur. İlgili çalışmalar, kuersetinin ince bağırsağın üst kısmında emildiğini göstermektedir (Keranmu vd., 2021).



Şekil 1.3. Kuersetin farmakolojik etkilerinin gösterimi

1.5. Kuersetinin Farmakokinetik Özellikleri

İnsanlarda kuersetinin farmakokinetiği üzerine yapılan ilk araştırma, tek bir oral dozdan sonra çok zayıf oral biyoyararlanım olduğunu göstermiştir (~%2). Kuersetinin doğal olarak oluşan formu olan kuersetin glikozitin tahmini emilimi, 100 mg alan sağlıklı bireylerde %3 ila %17 arasında değişmektedir. Kuersetinin nispeten düşük biyoyararlanımı, düşük emilimine, artmış metabolik faaliyetlerine ve hızlı eliminasyonuna bağlanabilir (Li

vd., 2016). Flavonoit yapılarının genel olarak yağda çözünürlüğünün zayıf olması da biyoyararlanımı etkileyen önemli faktörlerden birisidir (Keranmu vd., 2021).

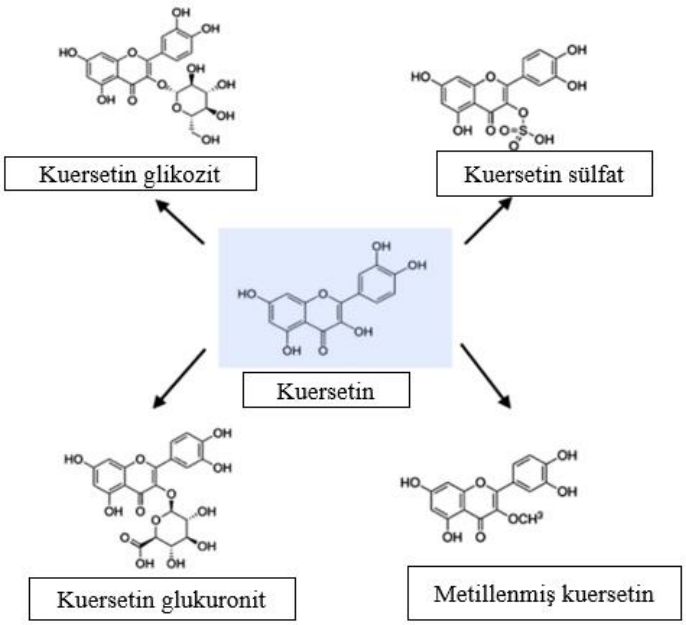
Kuersetin suda (0,17-7 μg/mL), mide sıvılarında (5,5 μg/mL) ve ince bağırsak sıvılarında (28,9 μg/mL) nispeten düşük çözünürlüğe sahip fito-etkili bileşiği olmasının sonucu olarak, bu sıvılarda çökme eğilimi de gösterir. Bu durum kuersetinin emilimi için mevcut miktarı yani bioyararlanımı azaltır. Buna ek olarak, kuersetin suda çok fazla çözünürse (örneğin glikozit formunda), epitel hücre duvarlarındaki fosfolipit çift tabakaları geçemeyecek kadar polar olduğu için pasif bir mekanizma yoluyla da emilemeyebilir.

Kuersetin ayrıca insan vücudu ve bağırsak mikrobiyotası tarafından salgılanan metabolik enzimlerin varlığı nedeniyle gastrointestinal sistemde kimyasal dönüşümlere karşı oldukça hassastır. Kuersetin türevlerinin çözünürlüğü ve dönüşümü, hidroksil sayısı ve konumu gibi polifenolik moleküler yapısının yanı sıra kuersetin molekülüne bağlı şeker moleküllerinin sayısına ve türüne bağlıdır (Kandemir vd., 2022). Bu durum aynı zamanda kimyasal olarak degredasyonuna neden olabileceği çeşitli literatürlerde gösterilmektedir (Walle, 2004).

Üç gün boyunca 500 mg/kg kuersetin içeren bir diyetle beslenen domuzlar üzerinde yapılan kısa süreli bir çalışmada, kuersetinin plazma, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve dalakta dağılım gösterdiği bulunmuştur. Bunlar arasında, karaciğer ve böbrekteki kuersetin konsantrasyonu en fazla miktarda iken, beyin, kalp ve dalaktaki kuersetin miktarı daha düşüktür.

Kuersetinin plazma, akciğer, böbrek, kalp, karaciğer, timus, kas, kemik, beyin, dalak ve adipoz dokuda yaygın olarak dağıldığı 11 hafta boyunca 500 mg/kg kuersetin diyeti ile beslenen sıçanlar üzerinde yapılan uzun süreli bir çalışmada tespit edilmiştir. Bunlar arasında akciğer en yüksek içeriğe sahipken, beyin, viseral yağ dokuda ve yine dalakta en düşük içeriğe sahiptir (De Boer vd., 2005).

Kuersetin oral uygulamadan sonra üst bağırsakta emilir ve faz-II metabolizmasına uğrar (Li vd., 2016). Emilimden sonra kuersetin karaciğer, bağırsak, böbrek gibi çeşitli organlarda glukuronatlı, sülfatlı veya metillenmiş bileşikler (Şekil 1.4) oluşturmak üzere metabolize edilir (Colunga Biancatelli vd., 2020; Keranmu vd., 2021).



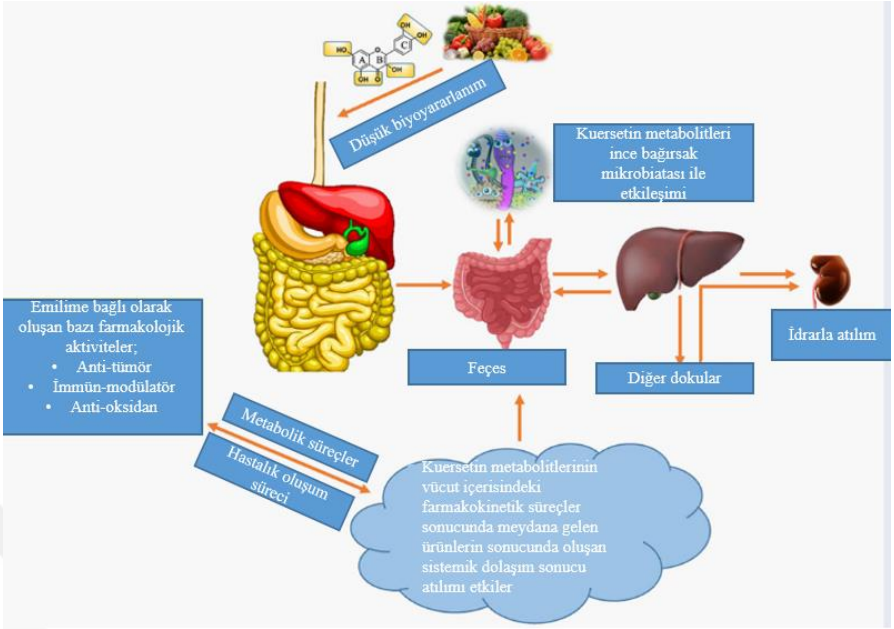
Şekil 1.4. Kuersetin metabolitleri (Li vd., 2016)

Kuersetinın atılımı dışkı ve idrar yoluyla sağlanır ve ortalama 3,5 saatlik yarı ömrü bulunmaktadır. Yüksek miktarda alındığında akciğerlerden de atılım gösterebilmektedir. Böbrek, kuersetin için ana eliminasyon organıdır. İnsan oral kuersetin klirens oranı (CL/F) yüksektir ($3.5*10^4$ L/saat). Kuersetine ait farmakokinetik özellikler Şekil 1.5'te gösterilmiştir.

BCS (Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi) ilk olarak ilaç keşfine rehberlik edecek bir yardım olarak yeni ilaçların geliştirilmesi için tanıtılmıştır. Bu sisteme dayanarak, hem emilim hem de çözünürlük, bağırsak mukozasının hücreleri yoluyla ilacın vücut içerisindeki dağılma yeteneğini de gösterir. Ayrıca ilgili ilacın konsantrasyonu ve emilim derecesi, arasındaki ilişkiyi etkileyen iki temel faktördür. Belirli kimyasal bileşiklerin BCS sistemi kullanılarak sınıflandırılması, insan organizması için biyoyararlanımlarının objektif bir şekilde değerlendirilmesine izin verir. BCS'ye göre ilaçlar dört kategoriye ayrılabilir: Sınıf 1 (yüksek çözünürlük, yüksek emilim), Sınıf 2 (düşük çözünürlük, yüksek emilim), Sınıf 3 (yüksek çözünürlük, düşük geçirgenlik) ve Sınıf 4 (düşük çözünürlük, düşük emilim).

Literatürlerde kuersetinin BCS sınıflandırması ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle, sırasıyla Fong (Fong vd., 2013), Madaan (Madaan vd., 2016) ve Waldmann (Waldmann vd., 2012) tarafından BCS Sınıf 1, 2 veya 4'e ait olduğu gösterilmiştir. Farklı çalışmalarda bildirildiği üzere, bu durum bileşiğin ekstrakte edildiği ya

da analiz edildiği kimyasal ürünün türüne göre farklılık gösterir. Dolayısıyla bu durum biyoyararlanımı ve biyofarmasötik sınıflandırmayı etkileyebilir (Truzzi vd., 2021).



Şekil 1.5. Kuersetin farmakokinetik özellikleri

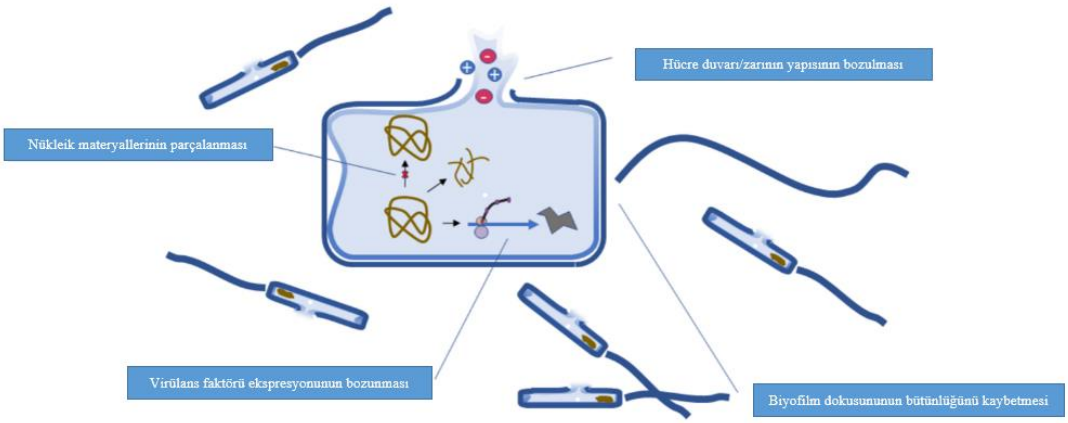
1.6. Kuersetinin Antibakteriyel Etkisi

Kuersetinin gastrointestinal, solunum, üriner ve dermal sistemler üzerinde var olan farklı bakteri gruplarına karşı antibakteriyel etkisi bulunmaktadır (Lenard vd., 2022). Kuersetinin antibakteriyel özelliği, çözünürlüğüne ve büyük ölçüde kuersetinin hidroksil gruplarının varlığı tarafından belirlenen bakteriyel hücre zarı ile etkileşimi ile ilişkilendirilmiştir (Cushnie ve Lamb, 2005).

Genel olarak, Gram-negatif bakteriler, kuersetinin bakterisidal etkilerine göre Gram-pozitif bakterilerden daha dirençlidir (S. Wang vd., 2018). Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasındaki kuersetin duyarlılığındaki farklılık, kısmen iki bakteri türü arasındaki hücre zarı bileşimindeki farktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Kopka vd., 2023).

Bununla birlikte, bazı kuersetin türevleri, Gram-negatif bakterilere karşı Gram-pozitif bakterilere göre daha güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir (Majumdar & Mandal, 2024). Kuersetinin farklı hidroksil gruplarında gerçekleşen fosforilasyon ve sülfasyon

reaksiyonları, çözünürlüğünü arttırmayı veya değiştirmeyi sağlamış ve böylece belirli bakteri türlerine karşı antibakteriyel potansiyelini değiştirdiğini göstermiştir (Osonga vd., 2019).



Şekil 1.6. Kuersetin antibakteriyel etki mekanizmaları (Lenard vd., 2022)

Kuersetin ve kuersetin türevlerinin farklı bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivitesi, farklı minimum inhibitör konsantrasyonlarını (MİK) meydana getirmiştir. Kuersetin on bir ana oral patojenik mikrobun büyümesi üzerinde antibakteriyel etkilerini gözlemlemiş ve kuersetinin, 1-8 mg/mL'den MİK ile *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Lactobacillus acidophilu, Streptococcus sanguis, Actinobacillus actinomycetemocomitans* ve *Prevotella intermedia* dahil olmak üzere test edilen on bir mikroptan altısının büyümesini engellediğini göstermiştir (Yi Shu, 2011).

Kuersetinin antibakteriyel mekanizması temel olarak 4 başlık altında toplanabilmektedir (Lenard vd., 2022). Bu mekanizmalar Şekil 1.6'da gösterilmiştir.

Bakteriyel Hücre Duvarlarının ve Hücre Zarının Bozulması

Wang ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada antibakteriyel aktivitenin temel mekanizması, alkalin fosfataz (ALP) ve β-galaktosidaz aktiviteleri tarafından tespit edildiği üzere bakteri hücre duvarlarının ve hücre zarlarının geçirgenliğinin bozulmasıdır (S. Wang vd., 2018). Bir diğer antibakteriyel mekanizmada da elektriksel iletkenliğin artması nedeniyle hücre zarı yapısının ve geçirgenliğinin bozulmasıdır. Böylece hücresel elektrolitlerin sızmasına neden olduğu bulunmuştur. Hücresel proteinlerin hasarını gösteren sonuçlar, protein jel elektroforezinden de elde edilmiştir (Zhao vd., 2015).

Nükleik Asit Sentezinin Bozulması

Kuersetin bakteri hücrelerinde nükleik asitlerin sentezini inhibe etmede önemli bir rol oynar. Kuersetin, *Escherichia coli* DNA girazının işlevini inhibe edebildiği, dolayısıyla DNA sentezinin bozulmasına yol açtığı bulunmuştur (Lenard vd., 2022). Yapılan çalışmalarda, kuersetinin, gönderilen GyrB'ye bağlanarak *Escherichia Coli* DNA giraz enziminin ATPaz aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada, kuersetin varlığında ve yokluğunda izole edilmiş DNA giraz alt birimlerinin floresansını ölçerek kuersetinin enzim bağlama aktivitesini belirlemişler ve bağlanma bölgesinin, ATP ve novobiyosin antibiyotiği ile örtüştüğü bulunmuştur (Plaper vd., 2003).

Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi

Kuersetin için diğer bir antibakteriyel mekanizması, çeşitli bakteri türleri tarafından biyofilm oluşumunun önlenmesidir. Kuersetin bakteriyel çekirdek oluşmasında yer alan yolaklara müdahale ettiği ve böylece hedef organlara bakteriyel adhezyonu önlediği bilinmektedir (D. Yang vd., 2020). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, kuersetin Gram-pozitif fırsatçı bir patojen olan *Enterococcus faecalis'in* biyofilm üretiminin neredeyse %95'ini inhibe ettiği bulunmuştur (Qayyum vd., 2019).

Virülans Faktörlerinin Azaltılması

Kuersetin, *Staphylcoccus aureus'un* temel bir virülans faktörü olan koagülaz enziminin aktivitesini inhibe ederek, sıçanları kateterle ilişkili *Stapylococcus* enfeksiyonlarından korumuştur. Kuersetinin meropenem ile kombinasyonunun, karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii*'de virülans faktörleri bla_{NDM} ve Ade*B*'nin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (L. Wang vd., 2019).

1.7. Bitkisel Kaynaklı Etkin Maddeler İçin Vezikül Yapılı Bazı Taşıyıcı Sistemler

Bitkisel kaynaklı etkin maddeler, DSÖ tarafından geçerli bir alternatif tedavi sistemi olarak, farmasötik ürünler ve takviye edici gıdalar sınıfında kabul edilmektedir. Ancak bitkisel kaynaklı etkin maddeler için konvansiyonel sistemler oldukça geleneksel kalmış ve güncelliğini yitirmiş durumdadır. Bitki aktif bileşikleri ve ekstraktları için yeni ilaç taşıyıcı sistemleri ve hedefleme çalışmaları için kapsamlı araştırmalar önem kazanmıştır. Ancak bu alanda yapılmakta olan çalışmalar da hala keşif sürecindedir. Bu çalışmalar düzenleyici otoriteler tarafından sıklıkla takip edilmektedir (Naik vd., 2023; WHO, 1998).

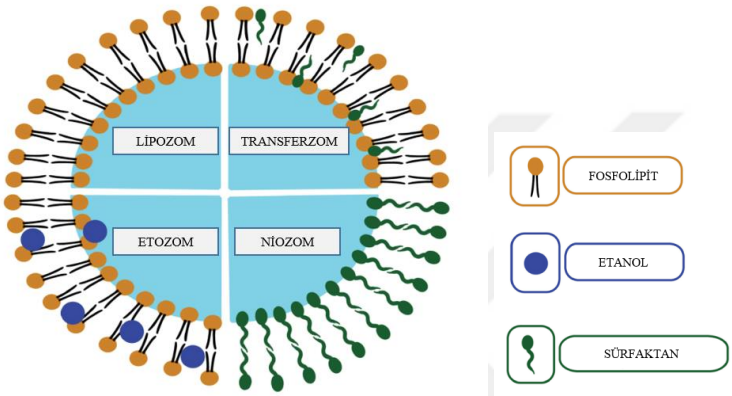
Flavonoitler, tanenler, terpenoitler gibi çeşitli bitkisel yapılar, geleneksel bitki ekstrelerine kıyasla yeni ilaç taşıyıcı sistemlere dâhil edildiğinde benzer veya daha az dozda artmış terapötik etki göstermiştir. Dolayısıyla, etkili şekilde ilaç taşınımı sağladığı için bitkisel ilaçlar için YİTS'lerinin geliştirilmesinde büyük bir potansiyel bulunmaktadır. Ayrıca, bitkisel ilaçlar için YİTS kullanma eğilimi endüstriyel ölçekte de benimsenmiştir (Anju Dhiman, 2015).

YİTS, bitkisel kaynaklı aktif bileşiklerle beraber kullanıldıklarında, ilaçların hedeflenmeyen alanlara birikmesiyle oluşan ilaç degredasyonunu ya da sistemik eliminasyon öncesi ilaç metabolizmasını azaltır ve oluşabilecek toksisitelerini en aza indirir ve hastalarda uygulama kolaylığını artırır (Goyal vd., 2011).

Bu taşıyıcı sistemler bitkisel kaynaklı etkin maddelerin olası lokal veya sistemik yan etkilerini azaltmak, fototoksisiteden korumak, stabilitesini artırmak gibi avantajlarını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Ayrıca hedeflendirme amacıyla da kullanılmaktadır (Naik vd., 2023). Bu taşıyıcı sistemlere, belirtilen avantajları elde etmek için aranan ve tercih edilen taşıyıcı sistemlere (Hani vd., 2023); lipozomlar, niozomlar, nanozomlar, fitozomlar, herbozomlar, marinozomlar, oleozomlar, ultrazomlar, fotozomlar, etozomlar, transferozomlar, kolloidozomlar, sfingozomlar gibi veziküler sistemler örnek olarak olarak sıralanabilir. Çok katmanlı taşıyıcılar; silikon taşıyıcılar ve matrisler; mikroemülsiyonlar gibi emülsifiye sistemler, çoklu emülsiyonlar, nanoemülsiyon; mikrojel, nanojel, sıvı kristaller; mikropartiküller gibi farklı sistemler, nanopartiküller, katı lipit nanopartiküller, nano yapılı lipit taşıyıcılar, mikrokapsüller, nanokapsüller, mikroküreler, nanokristaller ve siklodekstrinler gibi çeşitli sistemler örnek verilebilir (Alğin Yapar, 2017).

Lipozomlar, fosfolipitlerden üretilen hidrofilik çekirdeklerinde ya da lipit çift tabakası içinde farklı yapıları bulundurabilme yeteneğine sahip veziküllerdir (Nsairat vd., 2023). Günümüze kadar farklı hazırlama teknikleri ile oluşturulan lipozomlar, ilk olarak 1964'te üretilmiştir. 100 nm den 1 μm'ye kadar farklı boyutlarda hazırlanabilen lipozom yapıları konvansiyonel dozaj şekillerine alternatif olarak kullanılan vezikül yapılarından biridir. Ayrıca fito-etkili bileşikler için terapötik etkinliği artırdığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Yapının dezavantajları olmasına rağmen özellikle polifenolik bileşiklerde biyoyararlanımı ve stabiliteyi artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Gupta vd., 2019)

Etozomlar, sulu ve lipit yapılı olmak üzere iki farklı temel yapıdan oluşan ve % 20-50 etanol ile birlikte parçalanabilen lipit yapılı kısımlardan oluşur. Hem hidrofilik hem de lipofilik yapılı fito-aktif bileşikler dahil olmak üzere birçok bileşen bu sistemle birlikte taşınabilmektedir. Etozomal taşıyıcı sistemler, fosfolipit yapıları sayesinde fito-aktif bileşikleri, lipozomlar ve etanol içeren çözeltiler ile karşılaştırıldığında, etozom yapılarının biyoyararlanım parametrelerini artırdığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Terapötik aktivitede artış sağlanmış olmasının yanında *in vitro* ve *in vivo* parametreler değerlendiğinde ise güvenli bir profil sergilemiştir (Chacko vd., 2020).



Şekil 1.7. Taşıyıcı sistemlerden çeşitli örnekler (Barani vd., 2021b)

Transferzomlar, bir yüzey aktifleştirici madde olan sürfaktanlar ile birlikte bir lipit çift tabaka etrafında çevrelenmiş en az bir iç hidrofilik bölmeye sahip olacak şekilde özel olarak tasarlanmış veziküler taşıyıcı sistemlerdir. Esnek yapıları olmasından kaynaklı deriden kolaylıkla nispeten bozulmadan geçebilen bu yapılar için resveratrol, epigallo kateşin gallat, kurkumin ve ekstratları, kapsaisin, vinkristin gibi farklı yapı ve farmakolojik aktivitelere sahip fito-etkili bileşiklerle yapılan çalışmalarda etkililik düzeylerinde ve deriden geçişte artış gösterilmiştir (Opatha vd., 2020).

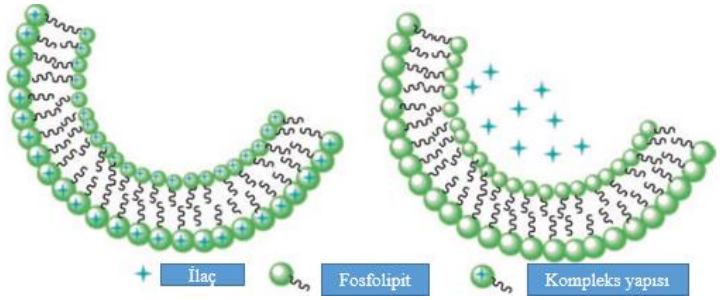
Niozomlar, 10 ila 1000 nm arasında değişen boyutlara sahip mikroskobik lameller yapılardır. Bu lameller yapılar, non-iyonik yüzey aktif madde ve yardımcı lipit olarak görev yapan kolesterol karışımı ve ardından sulu ortamda işlemi ile hazırlanır. Bu formülasyonlar lipozomlara çok benzer, ancak çift tabakaları iyonik olmayan yüzey aktif maddeler içerdiğinden daha fazla esnekliğe sahiptirler. Silibin, lawsone gibi fito-etkili bileşiklerde yapılan çalışmalarda akciğer kanserine etkili olduğu gösterilmiştir (Saha vd., 2021) (Şekil 1.7).

Bitkisel kaynaklı ilaç taşıyıcı sistemlere bir diğer alternatif olarak da nanopartikül yapılı taşıyıcı sistemler örnek verilebilir. Bu sistemler SLN (katı lipit nanopartikül), NLP (Nano lipit partikül), metalik kaynaklı nanopartiküller örnek verilebilir. Özellikle kanser tedavinde sıklıkla kullanımı olan ve hedeflendirme, stabilite, enkapsülasyon etkinlik ve verimliliği gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır. Lipit taşıyıcı sistemlerle beraber hibrit olarak da güncel araştırmalarda nanoprtiküler ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır (Sohail vd., 2022). Farklı taşıyıcı sistemler ve onlara ait karakterizasyon özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Farklı taşıyıcı sistemlere ait karakteristik özellikler

Karakteristik Özellikler	**Lipozom**	**Etozom**	**Niozom**	**Tranferzom**
Bileşenleri	Fosfolipitler ve Kolesterol	Fosfolipit, Alkol, Poligliserol ve Su	Non-İyonik Sürfaktanlar ve Kolesterol	Fosfolipit ve Sürfaktanların karışımı
Fiziksel Özelliği	Katı, Rijit	Elastik	Katı, Rijit	Kolay deforme olabilen
Kullanım Amacı	İlaç ve Gen Materyali Taşınımı	Deriden Taşınım	İlaç Taşınımı ve Kozmetik Uygulamalar	Deriden Taşınım
Uygulama Yolu	Oral, Parenteral, Topikal, Transdermal	Topikal ve Transdermal	Oral, Parenteral, Topikal, Transdermal	Topikal ve Transdermal
Temel Kazanımları	Biyouyumluluk, Kendi kendine oluşma kolaylığı, büyük miktarlarda etkin madde taşıma kapasitesi	İlaçların deri boyunca etkili bir şekilde geçirgenliğinin artırımını sağlamak	Çözünürlük artırımı, yüksek stabilite, düşük maliyetli malzemeler kullanımı	Cilt katmanlarında daha derin penetrasyon sağlayan yüksek deformasyon kabiliyeti
Dezavantajları	Stabilitenin zayıflığı ve deriden geçişin az olması	Düşük verimlilik, sulu ortama geçiş sırasında degredasyon, Organik ortamdan sulu ortama geçiş esnasında verim kaybı	Düşük cilt penetrasyonu ve yüzey aktif madde toksisitesi ihtimali	Sürfaktanların neden olabileceği toksisiteler
Market Ürünleri (Farklı amaçlara yönelik)	Doxil, Abelcet, Visudyne, DepoDur vb.	MaccabiCARE, Nanominox, Trima vb.	Lancome ve L'Oreal	Daktarin

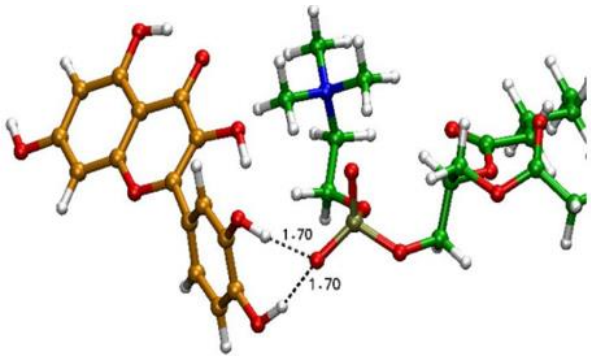
1.8. Fitozom



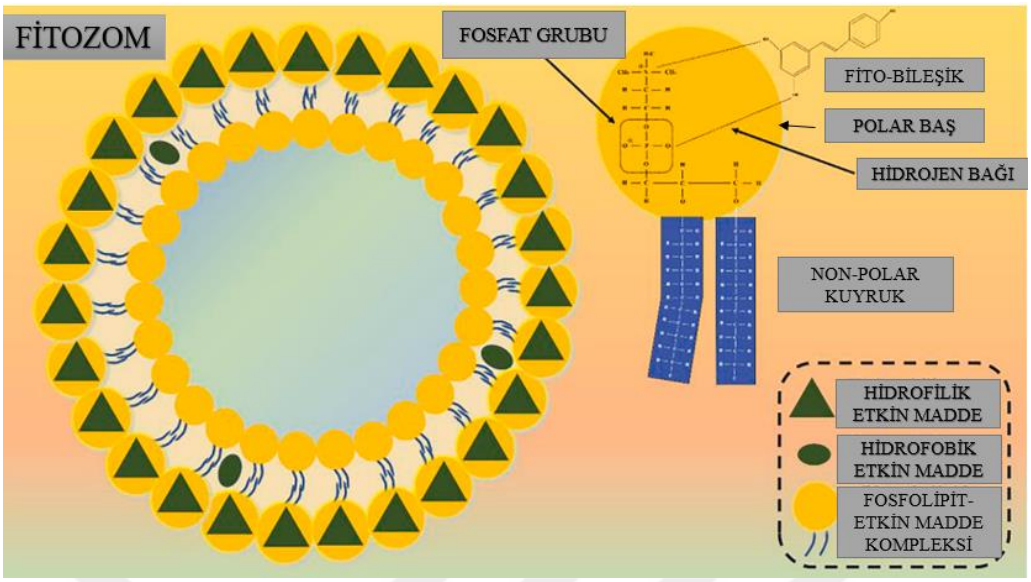
Şekil 1.8. Kompleks yapının şekil gösterimi (Barani vd., 2021a)

Fitozomlar, lipit yapılarının fito-bileşikler ile oluşturduğu kompleksleridir. Biyolojik olarak hücre membran yapısına kimyasal olarak çok benzerler (Şekil 1.8), bu nedenle hücre içine girişlerde ideal bir ilaç taşıyıcı sistemler olarak düşünülmektedirler. Bu duruma ilaveten, hidrofilik ve lipofilik ortamlarda gelişmiş stabilite göstermektedirler. Fitozomların komplekleşme mekanizması, polar olmayan bir çözücü kullanılarak, fosfolipitlerin fosfat grupları ile fitokimyasalların hidroksil kısımları arasında H-bağlarının oluşumuna dayanır (Şekil 1.9). Bunun için çeşitli karakterizasyon yöntemleri olarak XRD, FTIR ve NMR gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Hashemzadeh vd. (2023) tarafından yapılan çalışmada tam bir kompleksleşme olması için 2 tane hidroksil grubu ile fosfat grubuna bağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca bu komplekleşme için uygun hidrojen bağların enerjilerinin toplamının ve moleküler arası etkileşimin de önemli olduğu vurgulanmıştır (Hashemzadeh vd., 2023).



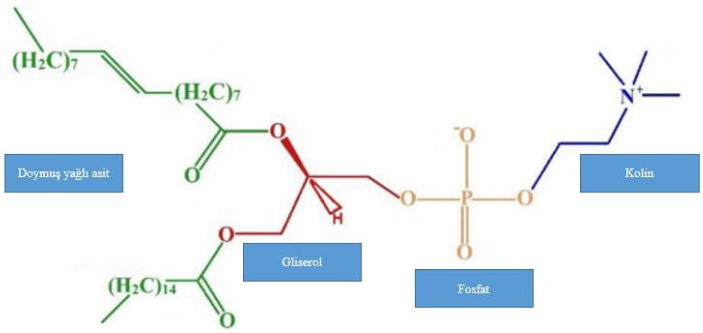
Şekil 1.9. Komplekleşme mekanizması (Hashemzadeh vd., 2023)



Şekil 1.10. Fitozom yapısı (Dutt vd., 2023)

Fosfotidilkolin (PC), kateşin gibi fito-bileşiklerle etkileşim için birincil olarak kullanılan bir fosfolipittir. Canlı hücrelerde bulunur, lipofiliklik ve hidrofiliklik sağlayan ayrılmaz bir moleküldür. PC'nin lipofilik ve hidrofilik ortam için karışabilirliği, makromoleküllerin, ilaç etkin maddelerinin ve fitokimyasalların emiliminde ve taşınmasında kolaylık sağlar.

Bu nedenle fosfat grupları sayesinde fitokimyasal bileşiklerin hidroksil gruplarıyla optimum etkileşimi ve H-bağlarının oluşumu için PC'nin uygun molaritede veya oranda kullanılması çok önemlidir (Şekil 1.10 ve Şekil 1.11).



Şekil 1.11. PC'nin kimyasal yapısı

Fitozomların formülasyonu için tercih edilen PC ve biyoaktif moleküllerin optimum oranı 1:1 veya 2:1'dir (Dutt vd., 2023; A. Singh vd., 2024). Fitozomlar, lipozomlara kıyasla daha yüksek ve artırılmış biyoyararlanım, ilaç salımı ve enkapsülasyon etkinliği sağlar.

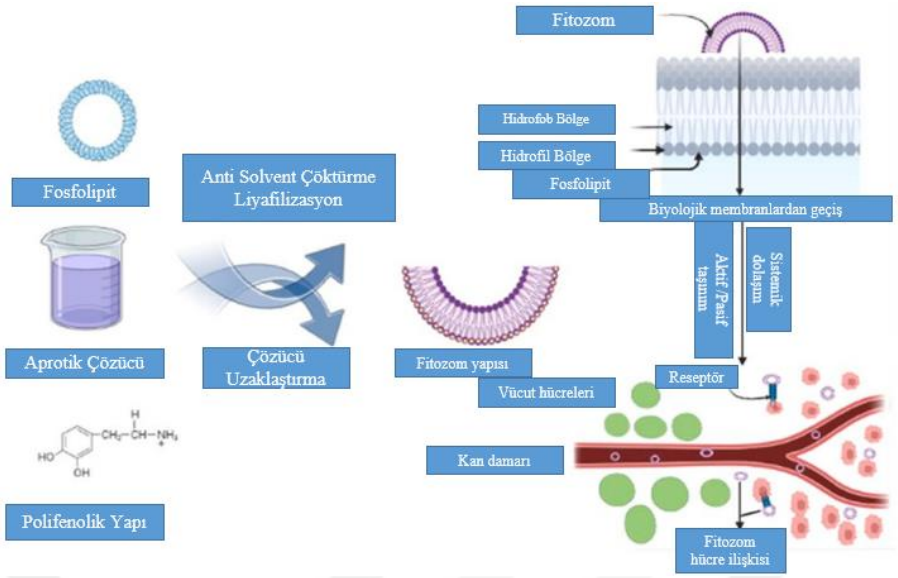
Fitozomların kimyasal yapısı, emilim yeteneği ile birlikte artmış stabilite ve raf ömrü sağlar. Lipozomlardaki fito-kimyasallar, lipitlerin fosfat gruplarına kimyasal olarak bağlı değildir, ancak çekirdekte veya lipit çift tabakasında kapsüllenir veya hapsedilir. Lipozomlardaki bağlanmamış fitokimyasallar, ortama sızmaya daha yatkındır. Fitozomlar, kimyasal olarak bağlıdır ve fitokimyasalları sızıntı ve enzimatik bozulmadan koruyarak stabilitesini ve taşıma kapasitesini artırmaktadır (Dutt vd., 2023).

Fitozomlar biyoyararlanımın ve absorbsiyon değerlerinin geliştirilmesi sayesinde doz miktarının azaltılmasını da sağlarlar. Fosfolipit yapısının varlığı sayesinde topikal veya kozmetik uygulamaya olanak vermesi ve yapının bozulmadan deriye nüfuz etmesine katkıda bulunması önemlidir. Kozmetik uygulamalarda güvenle kullanılması da fitozom yapılarının avantajları arasındadır. Fitozom yapıları oral uygulamaya yatkın olup, non-invaziv bir taşıyıcı sistem olduğundan ticari olarak kullanıma sunulması kolaylaşmıştır. Fitozomlar ince bağırsaktan emilim esnasında terapötik olarak etkinliğin artırılmasına da katkıda bulunmaktadır. Gelişen üretim teknikleri ile fitozom yapılarının ürün güvenliliği sağlanmaktadır, toksikoloji çalışmaları sonucunda güvenlilik yönüyle olarak daha iyi profil göstermektedir (Choubey, 2011; Mukrimaa vd., 2016; Prasad vd., 2016).

Fitozomlar, ilaç taşıyıcı olarak fazlaca avantaja sahip olmalarına rağmen yine de diğer ürünlere göre yaygın değildir. Çeşitli formülasyon sınırlamaları ve zorlukları nedeniyle, fitozomlar için ilaç taşıma sistemleri için ilk veya popüler bir seçenek değildir. Yamila B. Gnadola ve ark. (2014) yılında yaptıkları çalışmada lesitinin MCF-7 meme kanseri hücre hattında proliferasyonu indükleyebildiğini belirtmişlerdir (Saraf vd., 2022).

Fitozomlar çok sayıda üstün özellikler göstermesine rağmen birkaç temel dezavantajı ve sınırlaması aşağıda belirtilmiştir.

- Vezikül boyutunda tekdüzelik olmaması
- Veziküllerin kararsızlığı
- Yapıdan fitobileşiklerin sızması
- Düşük verim
- Yüksek üretim maliyeti
- Dozaj formu tasarımı gerekliliği ve optimizasyon zorluğu
- Vezikül veya kompleks yapının üzerinde aşırı madde birikmesi (Chivte vd., 2017)



Şekil 1.12. Fitozom yapısının hücre içine girişi (Gaikwad vd., 2023)

1.9. Fitozom Üretim Teknikleri

Fito-fosfolipit kompleksleri hazırlamak için üç ana teknik vardır (Şekil 1.13); dondurarak kurutma (liyofilizasyon), çözücü buharlaştırma ve anti-solvent ile çöktürmedir (Lu vd., 2019). Fitozom üretimi sırasıyla biyomateryal, organik çözücü (alkol türevleri ve aprotik çözücüler vb.) ve fosfolipitin berrak çözelti oluşmasına kadar karıştırılması, çözücünün buharlaştırılması ve ince tabaka oluşturulması, hidrasyon ve gerekiyorsa sonikasyon işlemlerinden oluşmaktadır (Karimi vd. 2015).

Farklı üretim teknikleri olmasına rağmen fitozom yapılarının hücre içine girişi benzerdir. Absorbe olduktan sonra hücre zarlarından geçişinin kolay olması yapısında bulunan fosfolipitten kaynaklıdır (Şekil 1.12). Bu durum sayesinde alternatif bir taşıyıcı sistem özelliği taşır (Alharbi vd., 2021).

Biyoaktif bileşenleri çözmek için aprotik çözücüler olarak dioksan, aseton, metilen klorür, tetrahidrofuran veya etil asetat kullanılabilmektedir. Ayrıca n-hekzan gibi alifatik hidrokarbonlara sahip bazı çözücüler, anti-solvent olarak da kullanılmaktadır (Gandhi vd., 2012; Karpuz vd., 2020). Çözücü, aktif bileşenlerin stokiyometrik oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi fito-fosfolipit komplekslerinin oluşumunu etkileyen başlıca parametrelerdir (Gaikwad vd., 2023). Fitozom üretim yöntemleri kullanılarak oluşturulan bazı çalışmalar Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Fitozom üretim teknikleri

Ürün İsmi	Hazırlama Yöntemi	Çözücü	Etkin madde: Fosfolipit oranı	Sıcaklık	Kimyasal Analiz	Karakterizasyon Özellikleri
Timokinon yüklü soya fosfolipit	Anti-solvent ile çöktürme	Diklorometan	1:1,1:3,1:5	-	FT-IR, partikül boyutu ölçümü, TEM, *in vitro* salım	-TEM verilerine göre, kompleks küre şeklindedir. -Vezikül boyutları 43,7 ila 129,9 nm arasında değişmektedir.
Terminalia arjuna fitozom	Çözücü buharlaştırma yöntemi	Diklorometan ve n-hekzan 40^{o}C'de 1,5 saat boyunca	-	40^{o}C	Enkapsülasyon etkinliği, DSC, SEM ve FT-IR	-DSC sonuçları 140.72^{o}C ve 212.45^{o}C'de eriyen lipit bileşenlerini ve etkileşimlerini gösteren iki pik göstermektedir. -En yüksek enkapsülasyon etkinliğini olarak %97,9 ± 0,4 bulunmuştur.
Kurkumin fitozom	Çözücü buharlaştırma yöntemi	Diklorometan, n-hekzan, pH 6.8 fosfat tamponu	1:1, 1:2. 1:3, 1:4 ve 1:5	40^{o}C	SEM, Enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* salım çalışması	-Parçacık boyutu: 181,6 nm, -Zeta potansiyeli: -33,2 mV, - Enkapsülasyon etkinliği : %76 ile 87.
Kakao çekirdeği özü fitozomu	Çözücü buharlaştırma yöntemi	Etanol	24 saat için 1:3	40^{o}C	Partikül boyutu dağılımı	- Ortalama partikül boyutu 627 nm'dir.
Ursalik asit fosfolipit kompleksi	Çözücü destekli uçurma yöntemi	Metanol, etanol, aseton, etil asetat	0.5:1, 1:1, 1.5:1 ve 1:2	40^{o}C	DSC, XRD, TEM, *in vivo* farmakokinetik çalışma	-Biyoyararlanımdaki artışla birlikte tek başına ursolik asitle karşılaştırıldığında gelişmiş ADME profili -SEM ve TEM' de küresel görüntü
Mirsetin nanofitozomu	İnce tabaka film hidrasyonu-sonikasyon tekniği	Diklorometan ve etanol	Mirsetin: fosfatidilkolin: kolesterol (1:1:0.4, 1:2:0.4, 1:3:0.4)	35^{o}C	Partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği	-Partikül boyutu (nm) 233.6 ile 250 arasında değişmektedir.
Protamin kaplanmış tripterin fitozomları	Çözücü buharlaştırma yöntemi	Susuz Etanol	1:3	40^{o}C	Partikül boyutu, SEM ve TEM	-Parçacık boyutu:250 nm (yaklaşık) -Zeta potansiyeli -21,6 mV -TEM, fitozomların üzerinde koyu renkli bir dış tabaka oluştuğunu göstermektedir.

1.9.1. Dondurarak kurutma veya liyofilizasyon

Fitoaktif bileşenler ve fosfatidilkolin uygun bir çözücüde çözündürülür, kompleks oluşuncaya kadar karıştırılır ardından liyofilizasyon yardımıyla çözücü uçurulur. Eğer çözücü aseton gibi organik bir çözücü ise, liyofilizasyon için kuru buz banyosunda formülasyonun yapısının çökmesini etkilemeden dondurma yöntemi kullanılır. Çökme sıcaklığı çeşitli çalışmalarda -39 °C ile -33 °C arasında bulunmuştur. Çeşitli dondurma yöntemleri incelenmiş ve hızlı dondurma yönteminin daha iyi etkin madde enkapsülasyon etkinliği ile fizikokimyasal parametrelerde daha az değişiklik sağladığı bulunmuştur (Hari Priya ve Kumaran, 2023).

1.9.2. Çözücü buharlaştırma/ince film hidrasyon yöntemi

Fosfolipit kompleksleri yapmak için geleneksel ve yaygın olarak kullanılan bir teknik çözücü buharlaştırmadır. Fosfotidilkolinler ve aktif bileşenler balonda yuvarlak dipte birleştirilir. Önceden belirlenmiş bir süre boyunca ideal sabit sıcaklıkta ısıtılarak bir çözücü içinde çözülür. Hazırlanan kompleksler, çözücünün vakum altında buharlaştırılmasıyla elde edilebilir (Gaikwad vd., 2023; Lu vd., 2019). Çözücülerin uçurulması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında çeker-ocak altında belirli süreler bekletme, rotary evaporator cihazı kullanılarak yapılan uçurmalar sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemlerde dikkat edilmesi gereken husus çözücünün uçtuktan sonra oluşan film yapısının balona yapışmasıdır. Bu durum önemli bir dezavantaj olup alternatif yöntemler geliştirilmelidir.

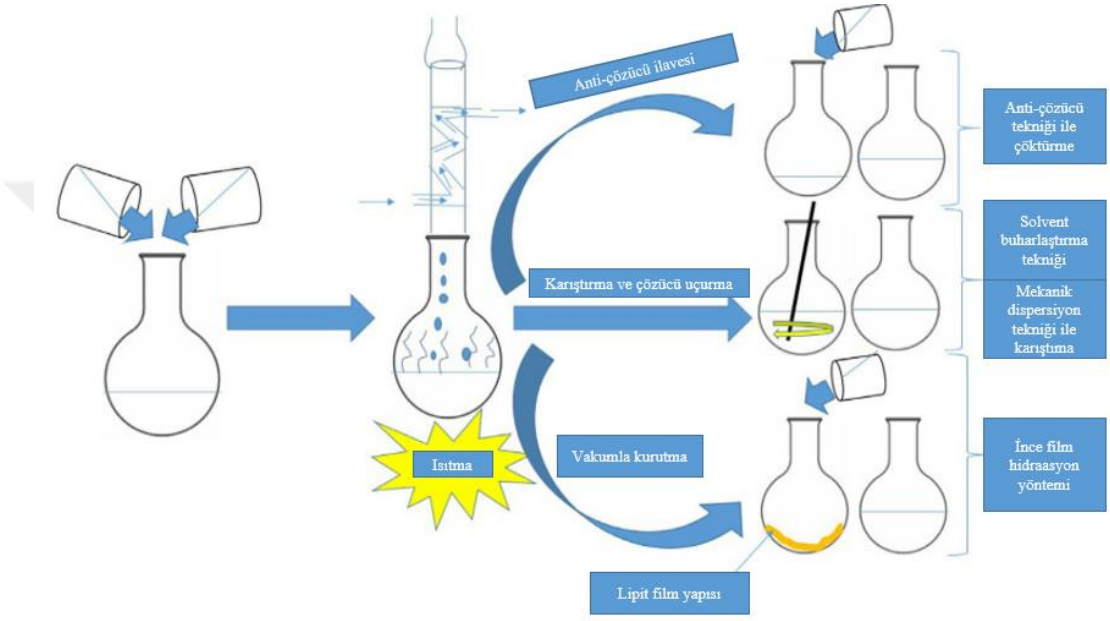
1.9.3. Anti-solvent ile çöktürme yöntemi

Bu yöntem ilk olarak Bombardelli ve ark. (1960) tarafından daha sonra fitozom olarak patent alan ürününde bahsedilmiştir. Bu yöntem, fitobileşenin ve fosfolipitlerin uygun bir çözücü içinde çözünmesini içerir. Bunu, çözeltinin konsantre edilmesi takip eder. İkinci bir solvent ki bu solvent anti-solvent olarak sistemin içinde çözünmediği ikinci bir çözücü çözeltiye ilave edilerek kompleks elde edilir. Bu daha sonra süzülür ve nihai ürünü elde etmek için kurutulur (Mukherjee, 2022).

Geleneksel yöntemlerin, çok adımlı süreçleri, zorlu üretimleri ve zaman tüketimi dahil olmak üzere çeşitli dezavantajları vardır. Yeni alternatif metotlar da bulunmaktadır.

İlgilenilen yapının boyutunu, şeklini ve morfolojisini değiştirmek için süper kritik sıvı yöntemleri kullanılabilir. Saflık özellikleri, kristal veya polimorfik yapısı, ısıya dayanıklı maddelerin varlığı önemlidir. Gaz çözücü karşıtı teknik (GAS), süperkritik çözücü karşıtı teknik (SAS) ve süperkritik akışkanlarla geliştirilmiş çözelti dispersiyonu (SEDS) teknikleri, çözünenin çözücüdeki çözünürlüğünü sınırlamak için çözücü karşıtı olarak süperkritik bir akışkan (tipik olarak CO_2 tercih edilir) kullanılan yöntemlerdir (Patel vd., 2023).

Fitozom üretim tekniklerinin şematik gösterimi Şekil 1.13'de verilmiştir.



Şekil 1.13. Fitozom üretim tekniklerinin şematik gösterimi (Mukherjee, 2022)

1.10. Fitozom Yapısının Karakterizasyonu

Fitozomlar, vezikül sınıfına ait olan taşıyıcı sistemlerde giderek önemli hale gelen fito-bileşiklerin taşınmasında önemli bir yapıdır. Fitozomların boyutunu, yapı bileşimini, morfolojisini ve çeşitli diğer fiziksel özelliklerini karakterize etmek için teknikler kullanılmaktadır. Birden fazla teknikle karakterizasyon özellikleri incelenebilecek ayrıca fiziksel özellikleri de mevcuttur. Farklı dezavantajlı ve avantajlı yöntemler en uygun yöntemin seçimini belirlerken, karakterizasyon için genellikle kombinasyon gerektiren yöntemler tercih edilir (Barani vd., 2021b).

Fitozom yapısının karakterizasyonu ve yapısal olarak özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler sayesinde yapının aydınlatılması kolaylaşmış olup farklı vezikül yapılarından ayrımı aydınlatılmasını sağlamaktadır (Lu vd., 2019; Singer vd., 2019).

Fitozom yapısının karakterizasyon özelliklerinin belirlenmesinde yüzey özellikleri ve yapısı, kimyasal olarak analizi, spektroskopik ve kromatografik yöntemler, partisyon katsayısı ve çözünürlük özellikleri ile ilaç etkin madde enkapsülasyon etkinliği gibi özellikler bu çalışmalar kapsamında incelenmektedir (Mukrimaa vd., 2016). Bu çalışma analiz örnekleri Çizelge 1.3'te çeşitlendirilmiştir.

Çizelge 1.3. Fitozomların karakterizasyonu için kullanılan analitik yöntemler (Barani vd., 2021b)

Parametreler	**Yöntemler**
Boyut ve şekil	DLS, SEM, TEM, Optik Mikroskopi, Floresan Mikroskopi, AFM, Alan Akış Fraksiyonlaması, Nanopartikül İzleme Analizi, Taramalı İyon Algılama, Akış Sitometrisi, Kromatografik Yöntemler, Santrifüj ve DSC.
Yüzey yükü	DLS, Serbest Akış Elektroforezi ve Lazer Doppler Velosimetrisi.
Kimyasal bileşimi	FTIR, H_1 NMR, DSC, TGA Ve İnce Tabaka Kromatografisi.
Lamellarite ve stabilize	Nükleer Manyetik Rezonans, Küçük Açılı X-Işını Saçılımı, Elektron Mikroskopi Yöntemleri, DSC, TGA, DLS Ve UV-Vis.
Enkapsülasyon etkinliği ve çözünme hızı	Mini Kolon Santrifüjleme, HPLC, UPLC, UV-Vis, Diyaliz Membran, Enzimatik Analizler, Jel Elektroforezi, Alan Akışı Fraksiyonlama, *İn-Situ* Yöntem ve Sürekli Akış Yöntemleri.
Optimizasyon	Box-Behnken Tasarımı ile Deney Tasarımı Yöntemi.

1.11. Fitozom Yapısına Ait Market Çalışmaları

Fitozom teknolojisine yönelik birçok araştırma faaliyeti, artmış farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Çeşitli hastalıkları tedavi etmek için tasarlanan bitkisel kaynaklı etkin maddelere yönelik artan ihtiyaç, YİTS olan fitozomlar için market ürün ve endüstrileşme yaklaşımının geliştirilmesini gerektirmektedir. Bazı fitozom bazlı formülasyonlar, ilaç güvenliği ve bir ilacın insan vücuduyla nasıl etkileşime girdiği konusunda daha fazla araştırma yapılmasını sağlayarak klinik öncesi aşamada klinik deneme aşamasına geçmiştir; bu FDA onayı almak için kritik bir adımdır. 2007 yılında fitozom bazlı formülasyon üzerine ilk klinik çalışma gerçekleştirilmiştir (Alharbi vd., 2021).

İtalya merkezli bir ilaç şirketi olan Indena, cilt bakımı ve sağlık fitozom ürünlerinin öncü üreticilerinden biridir. Fitozom formülasyonları için esas olarak polifenolikler ve terpenoit fraksiyonları içeren standartlaştırılmış bitki özlerini kullanmaktadır. Ayrıca, Natural Factors (Kanada) ve Nature's Herbs de (ABD) fitozom formülasyonları üreticileridir (Sindhumol vd., 2010).

Fitozom teknolojisinin endüstrileşmesi ile birlikte giderek artan ilgi hem gıda takviyesi hem de kozmetik ürünlerin piyasa ürünü anlamında çeşitlenmesini sağlamıştır. Doz miktarı, farmakolojik aktivite, fito-aktif bileşen çeşitliliği sayesinde çok fazla piyasaya ürün sunulmuş bu ürünlerin bazı Çizelge 1.4.'te özetlenmiştir. Artan piyasa ilgisi klinik çalışmaları da beraberinde getirmiştir. Bunun için yapılan farklı gruplar üzerinde farklı çalışma metotları oluşturulmuş ve insan deney süreçleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için yapılan çeşitli tamamlanmış klinik çalışma örnekleri Çizelge 1.5'te özetlenmiştir (Hari Priya ve Kumaran, 2023).

Çizelge 1.4. Fitozom yapılarına ait bazı piyasa ürünleri

Ticari ürün	Aktif bileşen	Doz miktarı	Kategori	Farmakolojik aktivite
Ginseng Phytosomes®	Ginkozitler	150 mg	Kozmetik, nütrosötik	Cildin elastik gücünü artırır
Lecoselect®	*Vitis vinifera*'dan (Üzüm) elde edilen proantosiyanidinlerin ≥ %25.0 ile ≤ %30.0'u içerir	50-100 mg	Gıda takviyesi ve kozmetik ürün	Anti oksidan ve anti kanser aktivite
Siliphos®	*Sylibum marianum*'dan Silybin (HPLC ile ≥ %29,7 ≤ %36,3)	120 mg	İlaç, kozmetik ve gıda takviyesi	Anti oksidan, hepatoprotektif
Centella triterpenoid Phytosome™	*Centella asiatica*'dan elde edilen terpenler	60-120 mg	Kozmetik ürün, gıda takviyesi	Cilt rahatsızlıkları, ülser önleyici, yara iyileştirici,
Soyselect Phytosome™	*Glycine max*'ın (Soya) genistein ve daidzein'i	400 mg/gün	Terapötik	Antikarsinojenik, kardiyoprotektif, immünostimülatör
Madeglucyl Phytosome™	*Syzygium cumini*'den (Jamun) gelen tanenler	3 g/gün	Terapötik	Anti-hiperglisemik, anti-enflamatuar, antioksidan
Lymphaselect® Phytosome	*Melissa officinalis*'ten triterpenler	2-60 mg	Terapötik	Hipotansif, uykusuzluk
Merivaselect® Phytosomes, Curcumin Phytosome™	*Curcuma Longa*'dan elde edilen polifenoller	250-360 mg	Gıda takviyesi, kozmetik ürün	Anti-enflamatuar, osteoartrit, antikanser
Green tea Phytosome™	*Camellia sinensis* (Çay)'den elde edilen epigallokateşin, kateşin, epikateşin-3-O-gallat	400 mg	Nütrosötik	Antikanser, nutrasötik, antidiyabetik, anti enflamatuar
Gingkoselect Phytosome™	Ginkgo flavonoidleri	120 mg	Kozmetik	Yaşlanma ve kırışılıklık karşıtı

Çizelge 1.5. Fitozom yapılarına ait klinik çalışmalar

Çalışma	Koşullar	Müdahale Yöntemleri	Çalışma Tasarımı	Klinik Çalışma Aşaması ve Sayısı	Durum Safhası	Araştırma sonuçları
COVID-19 Hastalarında Kuersetin Fitozomunun Adjuvan Faydalarını İncelemeye Yönelik Deneme	COVID-19	İlaç: Standart COVID-19 bakımı Besin Takviyesi: Quercetin Phytosome (400 mg oral)	Randomize Müdahale Modeli: Paralel Atama Maskeleme: Yok (Açık Etiket) Birincil Amaç: Tedavi	3. Aşama NCT04578158	Tamamlandı	İnceleme kapsamında
Greenselect Phytosome®'un Obez Kadınlarda Kilo Kaybından Sonra Kilo Koruma Üzerindeki Etkileri	Obezite	Besin Takviyesi: Globes® Besin Takviyesi: Plasebo	Randomize Müdahale Modeli: Paralel Atama Maskeleme: Tek (Katılımcı) Birincil Amaç: Tedavi	4. Aşama NCT02542449	Tamamlandı	Kilo kaybını takiben kilonun korunması
Enginar ve Bergamot Fitozomu	Hiperkolesterolemi	Besin Takviyesi: Kombine Bergamot fitozomu ve Enginar yaprağı kuru ekstresi Kombinasyon Ürün: Plasebo	Randomize Müdahale Modeli: Paralel Atama Maskeleme: Üçlü (Katılımcı, Bakım Sağlayıcı, Araştırmacı) Birincil Amaç: Tedavi	Uygulanabilir Değil NCT04697121	Tamamlandı	Antikolesterolemik etki
Prostat Kanserli Erkeklerde Yüksek Doz Silibin-Fitozomun Etkisi	Prostat kanseri	İlaç: Silibin-Fitozom	Randomize Olmayan Müdahale Modeli: Paralel Atama Maskeleme: Yok (Açık Etiket) Birincil Amaç: Temel araştırmalar	2.Aşama NCT00487721	Tamamlandı	Artırılmış silibin konsantrasyonu

1.12. Kuersetin Fitozom Formülasyonlarına Ait Çalışmalar

Kuersetinin farklı amaçlar için piyasa preparatları bulunmaktadır. Düşük çözünürlük ve düşük biyoyararlanıma sahip olmasından kaynaklı olarak konvansiyonel dozaj şekillerine göre YİTS içinde formülasyonları tercih edilmektedir. Riva ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada İtalya menşeili Quercefit™ kuersetinin fitozom formülasyonu incelenmiştir. Çalışma yeni formülasyonun çözünürlüğü, simüle edilmiş gastrointestinal sıvılarda *in vitro* inkübasyon ile belirlenmiş ve kuersetin miktarı ultra performans sıvı kromatografisi ile tespit edilmiştir. Sağlıklı gönüllülerde açlık koşulları altında tek doz, randomize, altı sıralı/üç dönemli çapraz klinik çalışma (3 × 3 × 3 çapraz tasarım) dengeli bir proses işlem sırası ile yürütülmüştür. Yaş aralığı 18-50 olan her iki cinsiyetten on iki sağlıklı gönüllü çalışmaya alınmış; bir doz kuersetin ve iki farklı doz ilgili ürün film kaplı tabletler halinde oral yoldan uygulanmıştır. Farmakokinetik numuneler uygulamadan sonra on iki zaman noktasında (0 saatten 24 saate kadar) toplanmış ve kuersetin seviyeleri HPLC ile ölçülmüştür. İnsan klinik çalışmasında sağlıklı gönüllüler tarafından hem *in vitro* çözünürlükte hem de oral emilimde (hem maruz kalma hem de elde edilen maksimum konsantrasyon açısından), formüle edilmemiş kuersetin ile karşılaştırıldığında kuersetin fitozom formülasyonu ile önemli gelişmeler elde edilmiştir. Yaklaşık olarak plazma kan konsantrasyonu 3-5 kat artmıştır (Riva vd., 2019).

Ağır akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) tarafından tetiklenen ve koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak bilinen mevcut pandemi, dünya çapında yıkıcı sağlık, psikolojik ve mali sonuçlara yol açmıştır (Kim ve Ryu, 2021; Lindinger-Sternart vd., 2021). Francesco Di Pierro ve ark. (2021) tarafından yürütülen Pakistan'da yapılan çalışmada prospektif, randomize, kontrollü ve açık etiketli çalışmada, günlük 1000 mg kuersetin fitozom (Quercetin Phytosome®) dozu, erken semptomların tedavisinde ve hastalığın ciddi sonuçlarının önlenmesinde yardımcı etkisini ortaya çıkarmak için 152 COVID-19 hastasında 30 gün boyunca uygulanmıştır. Ayakta tedavi gören 152 COVID-19 semptomatik hastanın dahil edildiği 30 günlük, prospektif, randomize, kontrollü, açık etiketli ve pilot klinik çalışmada elde edilen sonuçlara göre, günlük 1000 mg/gün dozunda formüle edilmiş kuersetin (her biri 500 mg'lık 2 günlük doz) adjuvan tedavi olarak kullanılmıştır, soya lesitini ile verilen 400 mg kuersetine karşılık gelen formülasyona sahip ilaçlar dikkate alınarak kullanılmıştır. Tüm klinik sonuçları (hastanede yatış ihtiyacı ve süresi, in vaziv olmayan oksijen tedavisi ihtiyacı, yoğun bakım ünitelerine ilerleme ve ölüm)

istatistiksel olarak iyileştirmiş ve aynı zamanda tüm denekler tarafından iyi tolere edilmiştir (Pierro vd., 2021).

Menopoz evresi kadınlarda artan vücut ağırlığı, metabolik işlev bozukluğu, kemik mineral yoğunluğu kaybı, diyabet, kas fonksiyonlarında bozulma, hiperlipidemi, psikolojik ve ruh hali değişiklikleri, artan enflamatuar belirteçler ve hücre membranlarının lipit peroksidasyonuna ayrıca proteinlerin ve DNA'nın hasar görmesine neden olabilecek oksidatif stres gibi farklı semptomlarla ilişkilidir (Cury Rodrigues vd., 2013).

Kuersetinin de farmakolojik aktivite olarak bilinen en önemli özelliklerinden biri de antioksidan aktivitesidir (Zhou vd., 2023). Fito-östrojen hormon olarak da bilinen kuersetin için Abd El-Fattah ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada kuersetinin biyoyararlanımını artırmak için, ince film hidrasyon yöntemini kullanarak kuersetin yüklü fitozom nanopartikülleri (QP) hazırlanmıştır. Hazırlanan QP'ler farklı teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Yapılan karakterizasyon işlemlerinde TEM görüntüsünün, kuersetin fitozomlarının homojen olarak küresel, iyi ve düzgün dağılmış, nano boyuta uygun olduğunu göstermiştir. QP'nin dinamik ışık saçılımı ölçümleri de (70 ± 7.44 nm) bunu doğrulamıştır. Oluşturulan nanopartiküllerin kararlılığı zeta potansiyel tayini ile belirlenmiştir. Hazırlanan QP'ler çok yüksek enkapsülasyon etkinliği (%98,4) sergilemiştir. QP'nin enflamasyon, oksidatif stres, kemik, lipit profili, kan glukoz seviyesi ve kilo alımı ile ilgili östrojenik aktivitesi, ovariektomize sıçan modelinde 4 hafta boyunca 10 ve 50 mg/kg/gün oral dozlar kullanılarak araştırılmıştır. QP ile tedavi serum kalsiyum, inorganik fosfor ve glutatyon içeriğinde anlamlı artış göstermiştir. Öte yandan, serum alkalin fosfataz, asit fosfataz, malondialdehit seviyesi, tümör nekroz faktörü-alfa ve glikoz seviyesini önemli ölçüde azaltmış ve lipit profilini iyileştirmiştir. Sonuç olarak, elde edilen sonuçlar QP'nin alternatif bir hormon replasman tedavisi olarak aynı dozlarda serbest kuersetine göre üstünlüğünü göstermiştir (Abd El-Fattah vd., 2017b).

Kuersetinin antikanser aktivitesi, duyu reseptörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve androjen reseptörleri gibi çok sayıda reseptörle etkileşimlerin yanı sıra kanseri başlatabilecek enzim sisteminin inhibisyonu ve kanser gelişiminde rol oynayan sinyal sisteminin modifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalara bağlanmaktadır. Ayrıca, kuersetin kombine edildiğinde sisplatin gibi kemoterapötik ajanların terapötik aktivitesini artırır (Saadat vd., 2019). Benzer şekilde, çok sayıda molekülün bir karışımı olan akrep zehiri (SV), çeşitli

hücre hatlarına karşı *in vitro* olarak potansiyel etkili bir antikanser aktivitesi göstermiştir (Goudet vd., 2002)

Alhakamy vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada kuersetin-SV fitozomlarını formüle etmek ve optimize etmek için deneysel tasarım kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar nano boyutta ve yüksek zeta potansiyeline sahiptir. Optimize edilmiş kuersetin-SV fitozomları, kuersetin formülü uygulamasının, boş formül ve kuersetin ile karşılaştırıldığında kaspaz-9, Bcl-2 ve p53 mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Enflamatuar göstergeler açısından, kuersetin formülü, boş formülasyon ve tek başına kuersetin ile karşılaştırıldığında TNF-α ve NF-B aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Genel olarak, çalışmanın bulguları, geliştirilen optimize edilmiş kuersetin formülasyonunun meme kanseri tedavisi için umut verici bir terapötik yöntem olabileceğini göstermiştir (Alhakamy vd., 2021).

1.13. *İn vitro* Antibakteriyel Çalışmalar

Bitkisel kökenli çok sayıda alkaloit, flavonoid, glikozit, terpen, tanen ve polifenolün antibakteriyel aktivite gösterdiği gösterilmiştir. Birçoğunun mevcut antimikrobiyal ilaçlarla sinerjistik etkiler gösterdiği de bilinmektedir (Ncube vd., 2008). Son zamanlardaki birçok çalışma, potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak bitki ve mikrobiyal ekstraktların, uçucu yağların, saf sekonder metabolitlerin ve yeni sentezlenmiş moleküllerin araştırılmasına odaklanmıştır (Balouiri vd., 2016).

İn vitro antibakteriyel testler, tarama sürecinde hâlâ çok önemlidir. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) eski adıyla Klinik Laboratuvar Bilimi Ulusal Komitesi (NCCLS) olarak bilinen çeşitli kuruluşlar, Britanya Antimikrobiyal Kemoterapi Derneği (BSAC) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST), bitki ekstraktlarına daha iyi uyacak şekilde değiştirilebilen geleneksel ilaçlar üzerinde bakteriyel duyarlılığın test edilmesine yönelik çeşitli kılavuzları onaylamışlardır (Tan ve Lim, 2015).

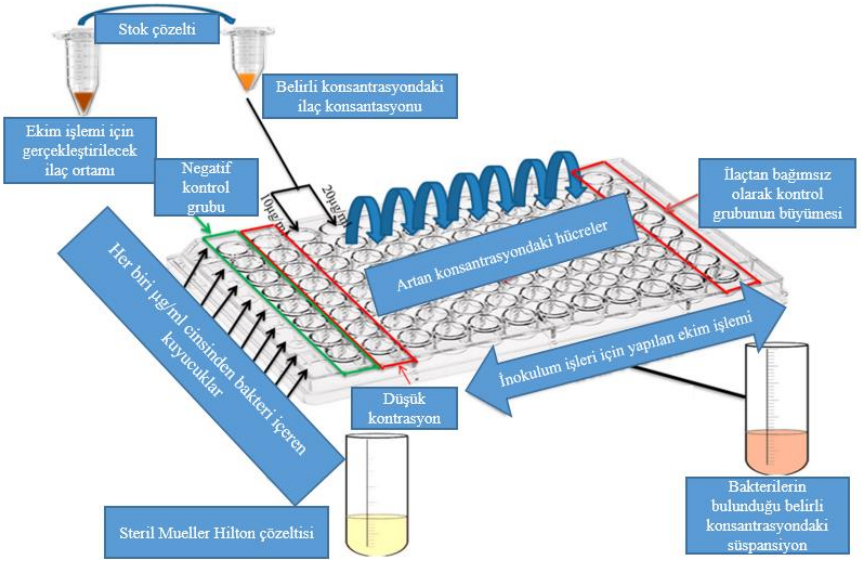
İn vitro anti-bakteriyel testler arasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak difüzyon metodu, dilüsyon yöntemi, zaman-ölüm oranı testi, ATP biyolüminesans ve akış sitometrisi gibi yöntemler bulunmaktadır (Balouiri vd., 2016)

Seyreltme yöntemleri, test edilen antimikrobiyal maddenin agardaki (agar seyreltme) veya sıvı besiyerindeki (makrodilüsyon veya mikrodilüsyon) konsantrasyonunu tahmin etme olanağı sunduğundan, MİK değerlerinin belirlenmesi için uygun kabul edilen testler arasındadır. Bakteri ve mantarlara karşı *in vitro* antimikrobiyal aktiviteyi niceliksel olarak ölçmek için Broth (sıvı besiyeri) veya agar seyreltme yöntemleri kullanılabilir.

Kaydedilen MİK değeri, antimikrobiyal maddenin, test edilen mikroorganizmalara karşı büyümesini inhibe eden en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır ve genellikle mg/ml veya mg/l cinsinden ifade edilir. Güç üreyen veya üremeyen bakterilerin, mayaların ve filamentli mantarların seyreltme antimikrobiyal duyarlılık testlerine yönelik birçok onaylanmış kılavuz bulunmaktadır.

Broth mikro veya makro-dilüsyon en temel mikrobiyal duyarlılık testi yöntemlerinden biridir. Prosedür, antimikrobiyal ajanın (örn. 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 mg/mL) minimum 2 mL hacimli tüplerde (makrodilüsyon) veya 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası (mikrodilüsyon) kullanılarak daha küçük hacimlerde dağıtılan sıvı bir üreme ortamında iki kat seyreltilmesini içerir (Şekil 1.14). Daha sonra her tüp veya kuyucuğa, $5x10^8$ ölçeğine ayarlanmış standardize mikrobiyal süspansiyonun seyreltilmesinden sonra aynı ortamda hazırlanan mikrobiyal inokülum ile inoküle edilir. İyice karıştırıldıktan sonra inoküle tüpler veya 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası, test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında (çoğunlukla çalkalamadan) inkübe edilir (CLSI, 2012).

Agar seyreltme yöntemi, antimikrobiyal ajanın istenen farklı konsantrasyonlarının bir agar besiyerine (erimiş agar besiyeri) dahil edilmesini, alışılageldiği üzere iki kat seri seyreltmeler kullanılmasını ve ardından tanımlanmış bir mikrobiyal inokulumun agar plak yüzeyine aşılanmasını içerir. MİK son noktası, uygun inkübasyon koşulları altında büyümeyi tamamen engelleyen en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu olarak kaydedilir (Chaturvedi vd., 2002).



Şekil 1.14. Mikro dilüsyon yöntemi (Qidwai vd., 2018)

Bu tezin amacı kuersetin fitozom yapıları elde edilerek, fitozom yapılarına ait karakterizasyon işlemlerinin tamamlanması ve ardından saf kuersetinin kuersetin fitozom yapısıyla karşılaştırmalı olarak antibakteriyel aktivitesinin değerlendirilmesidir. Çeşitli literatürlerde kuersetin fitozom çalışmaları daha önce çalışılmıştır. Ancak kuersetin fitozom yapısının bazı karakterizasyon özellikleri, fizikokimyasal özellikleri ve çeşitli bakteri türlerindeki MİK değerlerinin daha önce çalışılmamış olması bu tez çalışmalarının temel odakları arasındadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

96 kuyucuklu mikro plaka	Or-Lab (Türkiye)
Cam Malzemeler	İldam (Türkiye)
Çalkalamalı İnkübatör	GFL 1080 (Almanya)
Diyaliz Membran(12000 Da)	Sigma-Aldrich (Almanya)
DSC	Shimadzu DSC-60 (Japonya)
Etüv	Heraeus B5050 (Almanya)
FTIR	Agilent Cary 630-FTIR (ABD)
Hassas Terazi	Sartorius BL210S (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı	Daihan Scientific Wisestir SMHS-6 (Kore)
Membran Filtre	Sigma-Aldrich, Almanya
Mikropipet	Eppendorf (Almanya)
Otoklav	Hirayama 795/1 (Japonya)
Petri kabı	Fıratmed (Türkiye)
pH metre	Mettler Toledo Seven Compact S210 (ABD)
Plastik enjektör	Set inject (Türkiye)
Rotary Evaporatör	Buchi R 100 (İsviçre)
Santrifüj Cihazı	Nüve NF1215 (Türkiye)
Santrifüj Tüpü	Microcult (Türkiye)
SEM	JEOL JSM-5600LV (Kore)
Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution 201 (ABD)
Su sistemi	Milipor Mili-Q Plus System (Fransa)
TEM	JEOL JEM-1220 (Kore)
Vortex	Heidolph (Almanya)
XRD	Malvern Panalytical Empyrean Nano
Zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Nano ZS, Malvern (İngiltere)

2.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Diklorometan	Sigma Aldrich (Almanya)
DMSO(Dimetil sülfo oksit)	Sigma Aldrich (Almanya)
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich (Almanya)
Kuersetin	Sigma Aldrich (Almanya)
L-α- Fosfotidilkolin	Merck (Almanya)
Metanol	Sigma Aldrich (Almanya)
Mueller-Hinton Agar(MHA)	Fluka (Japonya)
Mueller-Hinton Broth (MHB)	Fluka (Japonya)
Oktanol	Sigma Aldrich (Almanya)
Pankreatin	Sigma Aldrich (Almanya)
Pepsin	Sigma Aldrich (Almanya)
Potasyum dihidrojen Fosfat	TEKKİM (Türkiye)
Siprofloksasin	Sigma Aldrich (Almanya)
Sodyum hidroksit	Sigma Aldrich (Almanya)
Sodyum klorür	Sigma Aldrich (Almanya)
Trifloro Asetik Asit	Merck (Almanya)
Tween-80	Sigma Aldrich (Almanya)

2.3. Yapılan Çalışmalarda Kullanılmış Ortamlar ve Hazırlanışı

0,1 N HCl Çözeltisi (Europian Pharmacopeia 8)

HCl çözeltisi (derişik) ..... 8,5 ml

Ultra saf su…….y.m ..... 100 ml

Hazırlama yöntemi: Bir miktar su behere alınır. 8,5 ml alınan derişik HCl içeren stoktan alınır ve ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

0,1N NaOH Çözelitisi (Europian Pharmacopeia 8)

NaOH .....4,4 g

Ultra saf su…….y.m ..... 100 ml

Hazırlanış: 4,4 g NaOH bir miktar ultra saf suda çözündürülür. Çözelti hacmi ultra saf su ile 100 ml'lik hacim olacak şekilde tamamlanır.

pH 1,2 tampon çözeltisi (United States Pharmacopeia-National Formulary 27)

NaCl .....2 g

HCl çözeltisi (derişik) ..... 7 ml

Ultra saf su…….y.m ..... 1000 ml

Hazırlanış: 2 g NaCl Ultra saf suda çözündürülür, 7 ml derişik HCl çözeltisinden üzerine ilave edilir. Çözelti pH'sı gerekli ayarlı çözeltiler ile pH 1,2'ye göre ayarlanır ve ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

pH 6,8 tamponu (Europian Pharmacopeia 9)

KH_2PO_4 .....6,8 g

NaOH .....0,64 g

Ultra saf su….y.m ..... 1000 ml

Hazırlanış: 6,8 g KH_2PO_4 ve 0,64 g NaOH tartılır. Bir miktar ultra saf suda çözündürülür, pH'sı 6,8'e göre ayarlı çözeltiler ile ayarlanır ve çözelti ultra saf su suyla 1000 ml'ye tamamlanır.

%0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 tamponu

KH_2PO_4 .....6,8 g

Tween 80.....0,2 g

NaOH .....0,64 g

Ultra saf su…….y.m ..... 1000 ml

Hazırlanış: 6,8 gram KH_2PO_4'ten ve NaOH'tan 0,64 gram tartılır. Ultra saf su ile çözündürülür. pH 6,8 olacak şekilde ayarlı çözeltiler ile ayarlama yapılır. Tween 80'den 0,2 gram alınır. Tampon çözeltisinden bir miktar alınarak disperse edilir. Son çözelti 1000 ml olacak şekilde tamamlanır.

Suni Mide Ortamı (SGF) (INFOGEST- Europian Pharmacopeia)

NaCl .....2 g

Pepsin enzimi .....3,2 g

HCl çözeltisi (Derişik) ..... 7 ml

Ultra saf su……y.m ..... 1000 ml

Hazırlanış: 2 g NaCl ultra saf suda çözündürülür. Çözeltiye 3,2 g pepsin enzimi ve 7 ml derişik HCl çözeltisi eklenir. Çözeltinin pH değeri 1,2 olacak şekilde ayarlı çözeltiler ile ayarlandıktan sonra ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Suni Bağırsak Ortamı (SIF) (INFOGEST- Europian Pharmacopeia)

KH_2PO_4 .....6,8 g

0,2N NaOH ..... 7,7 ml

Pankreatin enzimi.....10 g

Ultra saf su…..……y.m..... 1000 ml

Hazırlanış: 6,8 g KH_2PO_4 250 ml ultra saf suda çözülür. 7,7 ml 0,1 N NaOH ve 500 ml ultra saf su eklenir. Çözeltiye 10 g pankreatin enzimi ilave edilir ve karıştırılır. Ayarlı çözeltiler ile pH 6,8'e göre ayarlanır. Çözelti ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

2.4. Kuersetinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Kuersetinin fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi için yapılan çalışmalarda FTIR ile spektrumu alınmıştır. DSC ile termal analizi gerçekleştirilmiştir. UV spektrofotometrisi ile maksimum absorbans verdiği değer bulunmuştur ve SEM ile görüntüleri alınmıştır. XRD yöntemi ile ışık saçılımı ölçülmüştür.

2.4.1. Kuersetinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Spektrum Ölçülmesi

Kuersetinin FTIR analizi için Diamond ATR (Attenuated Total Reflectance) ilavesi olan cihaz kullanılmıştır (Agilent Cary 630-FTIR, Agilent Technologies). Yapısında bulunan elmas kristal sayesinde potasyum bromür kullanımına ihtiyaç duyulmayacak şekilde örnek numunenin FTIR analizinin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Kuersetin toz halde cihazın elmas kristal yapıdaki özel bölmesine yerleştirilir, hazırlandıktan sonra 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki FTIR spektrum alınır.

2.4.2. Kuersetin Ultraviyole (UV) Analizi

Kuersetinin 10 mg/100ml tampon ortamlarında (metanol içeren) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden hareketle uygun seyreltmeler yapılarak belirli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin UV spektrofotometresinde 200-400 nm aralığındaki dalga boyunda spektrumları alınmış ve maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyu saptanmıştır. Analiz için Thermo Scientific Evolution 201 (ABD) cihazı kullanılmıştır.

2.4.3. Kuersetinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile Analizi

Kuersetinin termal özelliklerinin incelenmesi amacıyla ve kristal formunun belirlenmesi için 4 mg etkin madde alüminyum pan içine yerleştirilen kuersetine ait toz parçaları preslenerek cihaza yerleştirilmiştir. 25-400 °C aralığında yapılan aralıkta, 10 °C/dakika hızda olacak şekilde sıcaklık artırılarak termogramlar elde edilmiştir. Analizler için Shimadzu DSC-60 (Japonya) cihazı kullanılmıştır.

2.4.4. Kuersetinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Kuersetinin yüzey yapılarının incelenmesi ve görüntülenmesi için JEOL JSM 5600 (Japonya) marka cihaz kullanılarak inceleme gerçekleştirilmiştir. Numunenin hazırlanması için altın-paladyum kaplama yapılmıştır. Yapılan kaplama sonucunda elde edilen görüntülemeler kaydedilmiştir.

2.4.5. Kuersetinin X-Ray Difraksiyonu (XRD) Analizi

Kuersetinin kristal yapıda olan özelliklerini belirlenmesinde faydalı olması amacıyla XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Malvern Panalytical Empyrean Nano (İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Tozlar analiz edilmeden önce bir lam üzerine film tabakası haline getirilmiş ve analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.5. Kuersetin için Miktar Tayini Çalışmaları

Kuersetin için miktar tayini çalışmalarında nispeten fazla çözünürlük gösterdiği ortamlar olan tamponlar ve bu ortamlara Tween 80 ilavesi ile miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. Bunun için 10 mg/100 ml kuersetin olacak şekilde stok çözeltileri (metanol içeren) hazırlanmıştır. Uygun seyreltmeler yapılarak pH 6,8 ortamı için 4-40 µg/ml arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ortamı için ise 2-24 µg/ml arasında olacak şekilde spektrofotometrede 372 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Standart doğru grafikleri oluşturulmuştur.

Bilinen konsantrasyon değeri x ekseni üzerinde, okunan absorbans değeri y ekseni üzerinde olacak şekilde doğru denklemleri oluşturulmuştur. Üçer paralel olacak şekilde analiz gerçekleştirilmiştir.

2.6. Kuersetinin Miktar Tayini Çalışmalarının Analitik Validasyonu

Analitik validasyonlar, yöntemlerin güvenilirliği, tekrarlanabilirliği açısından oldukça önemlidir. Miktar tayini yöntemlerinin validasyonları için ICH Q2 (R1) kılavuzu referans alınmaktadır (International Center of Harmonization, 1994). Kılavuz doğrultusunda yapılacak olan çalışmalar arasında doğrusallık ve aralığı, doğruluk, kesinlik çalışmaları kapsamında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları, özgünlük, teşhiş sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) ölçümleri gerçekleştirilecektir. Belirlenen değer ve aralıklar çeşitli literatür çalışmaları kapsamında referans değerler kabul edilerek oluşturulmuştur.

2.6.1. Doğrusallık ve Aralığı

Bir analitik yöntemin doğrusallık analizi, analiz işlemi için belirlenen aralıklar ile numune içindeki madde konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak analiz sonuçlarını verebilme kapasitesidir. Analitik işlemin aralığı ise doğrusallık aralığını sağladığı gösterilen analiz işlemi için numunede analiz edilen maddenin asgari ve azami konsantrasyonları arasındaki doğrusal aralıktır. Analitik işlemin doğrusallık oranı belirlenirken uygun istatistiksel hesaplamalar ile en küçük kareler yöntemi kullanılarak regresyon doğrusu elde edilir. Regresyon doğrusunun eğimi, korelasyon katsayı değeri, kesişim ve artık kareler toplamı belirlenerek arasındaki lineer ilişki değerlendirilir.

Kuersetin için doğrusallık çalışmaları kapsamında pH 6,8 ortamı için ve % 0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 ortamı için bu çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında r^2 değeri 1'e yakın olmalıdır. Bu çalışmalar için her iki ortam için de 100 µg/ml olarak hazırlanmış çözeltiler kullanılmıştır. Uygun seyreltmeler ile doğru grafiği elde edilmiş ve deneyler üçer kez tekrarlanmıştır.

2.6.2. Doğruluk ve Geri Elde

Doğruluk değeri, kabul edilmiş olan bir değer ile doğru denklemi ile elde edilmiş olan değerin arasındaki yakınlık ölçüsüdür. Bu çalışma hatasızlık ile ilişkilendirilir.

Doğruluk işlemi için en az üç farklı konsantrasyon değeri kabul edilir. Bunlar düşük, orta ve yüksek konsantrasyon değerleridir. Üçer kez hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler ile hazırlanan 3 farklı konsantrasyondaki çözeltiden 6'şar kez okunanarak elde edilirler. Bu konsantrasyonlar düşük, orta ve yüksek olarak pH 6,8 ortamı için 8,16,24 µg/ml iken Tween 80'li pH 6,8 ortamı için bu ortamlar sırasıyla 4, 12, 20 µg/ml olarak kabul edilmiştir. Analizi yapılan ortamlar için her birinin yüzdesel olarak geri eldeleri, standart sapma değerleri ve yüzde bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bağıl standart sapma değeri eğer % 2' yi aşmaması koşulu ile analitik yöntemin doğruluğu kabul edilmektedir.

2.6.3. Kesinlik

Kesinlik bir analit için yapılan aynı homojenliğe sahip numunenin belirli ve sabit koşullar altındaki çok sayıdaki analiz ölçümlerine dayanmaktadır. Kesinlik çalışmaları kapsamında tekrarkanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları yapılmaktadır. Kesinlik çalışmalarının sonuçları % bağıl standart sapma değerleri ile değerlendirilmektedir. Kuersetinin kesinlik çalışmaları kapsamında her iki ortam için de tekrarlanabilirlik çalışmaları ve ara kesinlik çalışması yapılmıştır.

2.6.3.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları, aynı işlem koşulları altında, aynı uygulayıcı tarafından gerçekleştirilen ayrıca kısa zaman aralıklarıyla yapılan ölçümler için kesinlik ölçümüdür. Spektrofotometrede elde edilen sonuçların doğru denklem karşılığındaki konsantrasyonlarının aritmetik ortalamaları, standart sapma değerleri ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanır. Analitik yöntemin tekrarlanabilirlik açısından kabul edilir olması için % bağıl standart sapma değerleri için %2'den büyük olmaması gerekmektedir.

2.6.3.2. Ara Kesinlik

Ara kesinlik, çalışmalar esnasında laboratuvar içerisinde deneysel ortam farklılıklarını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Farklı analist, farklı gün ya da farklı malzeme (ekipman) gibi çeşitli değişken parametrelerin incelenmesi amacı ile analiz çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmada 2 günlük analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen absorbans değerleri, doğru denklemindeki karşılığına gelen

konsantrasyon değerlerinden elde edilen ortalama, standart sapma değeri, bağıl standart sapma değeri sonuçları hesaplanır. Farklı konsantrasyonlara ait her iki ortamın ara kesinlik değerleri gün aşırı olacak şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar % 2 değerini aşmamalıdır.

2.6.4. Özgünlük (Seçicilik)

Analizi yapılacak olan kuersetin için belirlenen analiz koşul şartları ile kullanılacak olan diğer kimyasal maddelerden ayırt edilebilme özelliğinin belirlenmesidir. Diğer farklı maddelerin var olması durumunda, analiz edilen maddeyi ayırt ve tayin edebilme özelliği olarak tanımlanmaktadır.

2.6.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırları (LOQ) Belirlenmesi

Teşhis Sınırı (LOD)

LOD değeri analizi yapılacak numune için ölçülebilecek en küçük konsantrasyon değeri olarak kabul edilmektedir(International Center of Harmonization, 1994). LOD değerinin hesaplanabilmesi için 3 stok çözeltisinden hareketle farklı çözeltiler olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin kalibrasyon doğru grafiklerinin kesişim eğimlerinin standart sapmaları alınarak sabit 3.3 ile çarpılıp kalibrasyon grafiğinin eğimine bölünmesi ile bulunur.

$$LOD=(3.3 * SS)/m \qquad \text{Eşitlik 2.1.}$$

SS = Kesişim değerleri için standart sapma
m = Kalibrasyon doğrusu eğim değeri.

Tayin Sınırı (LOQ)

LOQ değeri için analizi yapılması gereken numune, uygun şekilde kabul edilmesi gereken doğruluk, kesinlik ile tayin edilebilen en düşük konsantrasyon düzeyidir. Yapılan çalışmalardan elde edilen kalibrasyon denklemlerinden yola çıkılarak hesaplanmaktadır.

$$LOQ = (SS/m) \times 10 \qquad \text{Eşitlik 2.2.}$$

SS: Kalibrasyon doğrularının kesişim değerlerinin standart sapması
m: Kalibrasyon doğrusunun eğiminin değeri

2.7. Kuersetin için Çözünürlük Deneyleri Çalışmaları

Etkin maddenin BCS 4 sınıfına ait olmasından kaynaklı olarak çözünürlük deneylerine ihtiyaç duyulmuştur. Kuersetin gastro-intestinal sistem içerisindeki çözünürlüğünü incelemek ve *in vitro* salım ortamındaki davranışları hakkında fikir sahibi olmasına katkıda bulunması kapsamında 25^{o}C ve 37 °C'lerdeki pH 1,2 ve pH 6,8 tampon ortamlarında çözünürlük çalışması yapılmıştır.

50 ml her tampon ortamına aşırı miktarda olacak şekilde ilave edilen kuersetinin 50 mg (1 mg/ml) ilave edilmesiyle olan dispersiyon ortamındaki çözünürlüğü, çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca incelenmiştir. 100 rpm olan dönü hızında 25 ve 37 °C'lerdeki ortamlardan belirli aralıklarda (2.,4.,6.,8.,12. ve 24.Saat) alınan numunelerde 0,45µm'lik rejenere selüloz asetat filtrelerden süzülmüştür. Elde edilen süzüntüler spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Deneyler üç kez olacak şekilde tekrarlanmıştır.

2.8. Kuersetin için Partisyon Katsayısı Çalışmaları

Kuersetinin biyolojik membranlardan geçiş özelliklerini incelemek amacıyla partisyon katsayısı deneyleri yapılmaktadır. Bu çalışmalar sayesinde etkin maddenin GİS ortamında nasıl bir karakter gösterdiği hakkında fikir sunabilmektedir. Yapılan çalışmalarda yağ ortamı olarak oktanol kullanılmaktadır. Kuersetinin sudaki çözünürlüğünün çok düşük olmasından kaynaklı olarak nispeten daha iyi çözündüğü ve biyolojik ortamları daha iyi taklit edebilmesi amacıyla su ortamı yerine pH 6,8 tamponu kullanılmıştır.

0,5 mg kuersetin 50 ml pH 6,8 tampon ortamına ilave edilmiş, üzerine 50 ml oktanol çözeltisi eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 100 rpm'de 37°C'de 24 saat boyunca çalkalanmıştır. 24. Saatin sonunda su fazı içindeki etkin madde spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Deneyler üç kez olacak şekilde tekrarlanmıştır. Aşağıda verilen eşitlik kullanılarak partisyon katsayısı hesaplanmıştır.

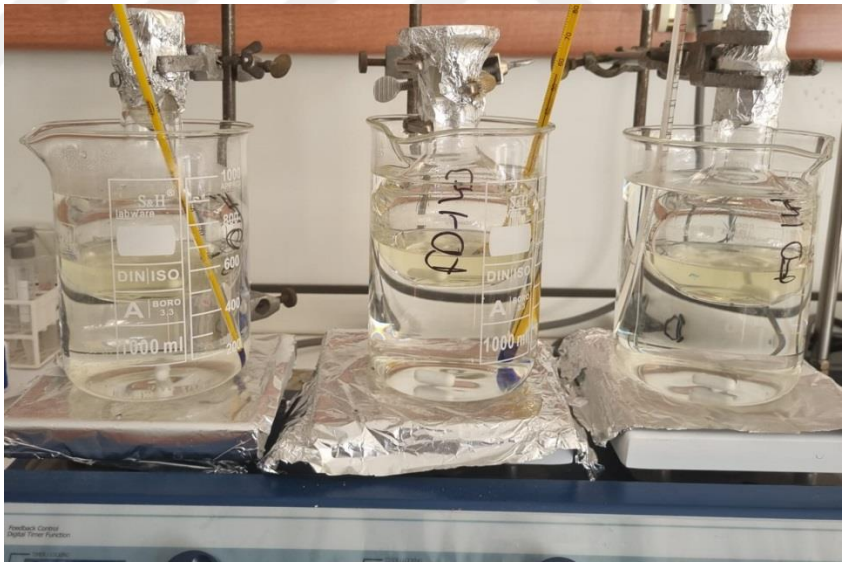
$$P_{y/s}=\log (C_{son}/C_{ilk}) \qquad \text{Eşitlik 2.3.}$$

P: Partisyon kaysayısı
C: Etkin maddenin su fazındaki konsantrasyonu (başlangıç ve deney sonu)

2.9. Kuersetin Fitozom için Yapılan Formülasyon Çalışmaları

Çalışmalarımızda kuersetinin fitozomlarını hazırlamak için öncelikli olarak kuersetin ve fosfotidilkolin için uygun çözücü tipleri belirlenmiştir. Bunun için yapılan ön formülasyon çalışmalarında kuersetin için metanol ve fosfotidilkolin için ise diklorometan denenmiştir. Bu çözücüler literatür çalışmalarından referans alınarak tercih edilmiştir. İkinci aşamada ise temel formülasyon parametreleri tayin edilmiştir. Literatür kaynaklarında fitozom yapılarının oluşturulmasında temel parametreler olarak etkin madde: fosfolipit oranı, sıcaklık ve reaksiyon süresi olarak belirtilmiştir (Chi vd., 2020; Lu vd., 2019). Bu tez çalışmaları, belirtilen parametreleri kullanarak formülasyon çalışmaları gerçekleştilmiştir.

Kuersetin 20 mg olarak sabit kalacak şekilde 1:1 (a/h) oranında metanolde 2 saat boyunca oda sıcaklığı ortamında 300 rpm dönü hızında olacak şekilde çözülmüştür. Fosfotidilkolin de aynı yöntemle 20 mg ve ilgili oranları olacak şekilde 1:1 (a/h) oranında diklorometanda çözülmüştür. Etkin madde ve fosfolipitin çözücülerdeki oranı 1:1 (a/h) olarak sabit tutulmuştur.



Şekil 2.1. Su ceketi sistemi örneği

Çözündürme basamağı gerçekleştirildikten sonra formülasyonları ısıtmak için formülasyon parametresindeki sıcaklığa getirilmiş su ceketi sistemi hazırlanmıştır (Şekil 2.1). Uygun hacimdeki (250 ml) cam balona önce etkin madde sonra ise fosfotidilkolin içeren çözeltiler ilave edilmiştir. Su ceketi sisteminde suyun sıcaklığı daha homojen

dağılması için manyetik karıştırıcı ile reaksiyon süresi boyunca karıştırılmış ve sürekli olarak termometre ile cam balonla aynı seviyede olacak şekilde sıcaklık kontrol edilmiştir.

Cam balon ağzı sıkıca kapatılmış olacak şekilde reaksiyon süresi boyunca olası hacim ve konsantrasyon kaybını önlemek amacıyla kontrol edilmiştir. Reaksiyon süresinin sonunda cam balon su ceketi sisteminden çıkartılmıştır. Çözücülerinin uçurulması için rotary evaporator cihazı kullanılmıştır. Rotary evaporatorde cihazındaki su havuzunda çözücünün buharlaştırılma işlemi sırasında su havuzu ile reaksiyon ortamının sıcaklığı aynı olması için önceden su haznesindeki su istenilen sıcaklığa getirilmiştir.

Çözücünün ortamdan uzaklaştırılma süresi formülasyona bağlı olarak değişmektedir. Uzaklaştırılacak çözücü miktarına göre sürenin değişmesinden kaynaklı olarak uçurma süresi bir formülasyon parametresi olarak kabul edilmemiştir. Formülasyon esnasında dönü hızı sabit tutulmuştur. Balonun altında ince film halde yapı oluşunca dönü sonlandırılmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Rotary evaporatorde gerçekleştirilen ince film yöntemi ile fitozom hazırlamanın gösterimi

Solvent uçurma basamağının ardından fitozom kompleks yapılarının balondan almak için yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi işlemi için pH 6,8 tamponu kullanılmıştır. Bu işlem esnasında sabit miktar olarak 80 ml tampon çözeltisi kullanılmıştır. Yıkama işleminin ardından balon içinde tampon çözeltisi bekletilmiş ve sonrasında santrifüj işlemi için eşit miktarlara bölünmüştür.

Fitozom komleksleri 30’ar dakika 5000 rpm olacak şekilde 2’şer kez santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. İlk santrifüj işleminin sonunda oluşan süpernatant çözeltileri toplanmış ve ikinci kez pH 6,8 tampon çözeltisi ile santrifüj edilmiştir. İkinci santrifüj işlemi esnasında yaklaşık olarak 40 ml tampon çözeltisi kullanılmıştır. İkinci santrifüj işleminin sonunda elde edilen süpernatant çözelti ile ilk elde edilen süpernatant çözelti birleştirilmiştir. Miktar tayini analizi yapmak için amber renkli cam şişelere konulmuştur.

Farklı etkin madde:fosfolipit oranları, sıcaklık ve karıştırma süreleri kullanılarak hazırlanan formülasonlar Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. Çizelge 2.1.’de ön çalışmalar olarak değerlendirilen formülasyonlar yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Formülasyon ön çalışmaları

Formülasyon	Etkin madde: Fosfolipit oranı (a:a)	Sıcaklık (^{o}C)	Karıştırma süresi (saat)
F-01	1:1	30	1
F-02	1:1	30	2
F-03	1:1	30	3
F-04	1:1	50	1
F-05	1:1	50	2
F-06	1:2	30	1
F-07	1:2	30	2
F-08	1:2	30	3
F-09	1:3	30	1
F-010	1:3	30	2
F-011	1:3	30	3

Çizelge 2.2. Formülasyon çalışmaları

Formülasyon	Etkin madde: Fosfolipit oranı (a:a)	Sıcaklık (^{o}C)	Karıştırma süresi (saat)
F-1	1:1	40	1
F-2	1:1	40	2
F-3	1:1	40	3
F-4	1:1	50	3
F-5	1:2	40	1
F-6	1:2	40	2
F-7	1:2	40	3
F-8	1:2	50	1
F-9	1:2	50	2
F-10	1:2	50	3
F-11	1:3	40	1
F-12	1:3	40	2
F-13	1:3	40	3
F-14	1:3	50	1
F-15	1:3	50	2
F-16	1:3	50	3
F-17	1:2,25	50	2
F-18	1:2,25	50	3
F-19	1:2,5	50	2
F-20	1:2,5	50	3

2.10. Hazırlanan Formülasyonlara Ait *İn Vitro* Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan tüm kuersetin fitozom formülasyonlarnın enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutu ve polidispersite indeks tayinleri ile zeta potansiyeli tayinleri yapılmıştır.

2.10.1. Enkapsülasyon Etkinlik Tayini

Kuersetin fitozomları oluşturulduktan sonra 2 kez santrifüjlenen dispersiyonlardan süpernatantlar toplanmış ve in direkt yöntem ile spektrofotometrik olarak 372 nm'de analizi yapılmıştır. Kuersetin miktarları belirlenmiştir (n=3).

% Enkapsülasyon etkinliği = [(Toplam Kuersetin miktarı – Serbest Kuersetin miktarı) / Toplam Kuersetin miktarı] x100 Eşitlik 2.4.

2.10.2. Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite Tayinleri

Hazırlanan kuersetin fitozom formülasyonları partikül büyüklükleri ve polidispersite indekslerinin ölçümleri için Malvern ZetaSizer (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılarak ölçümleri tayin edilmiştir. Alınan ölçümler formülasyonlar hazırlandıktan sonra beklemeden, ultra saf su ile disperse edilerek oda sıcaklığı şartlarında gerçekleştirilmiştir (n=3).

2.10.3. Zeta Potansiyeli Tayini

Hazırlanan kuersetin fitozomlarının yüzey yüklerinin belirlenmesi amacıyla zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlerin alınması için Malvern ZetaSizer (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra ultra saf su kullanılarak uygun seyreltmeler ile oda sıcaklığında ölçümleri yapılmıştır (n=3).

2.11. Optimum Formülasyonun Belirlenmesi

Optimum formülasyonun belirlenmesinde enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutu ile PDI ve zeta potansiyeli değerleri temel alınmıştır. Bu dört parametre değerlendirildikten sonra *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. Seçilen üç formül üçer paralel olarak yeniden üretilmiştir. Böylece bu formüller üzerinde üretim tekrar edilebilirlik çalışması yapılmıştır.

Bu formüllerin de enkapsülasyon etkinlikleri, partikül boyutları ile PDI'leri, zeta potansiyelleri ölçülmüş ve ilaveten çözünme hızı çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak bu beş parametre değerlendirilerek içlerinden bir formül optimum formül olarak seçilmiştir. En iyi salım profili gösteren formülasyon optimum olarak belirlenmiştir.

2.12. Optimum Formülasyona ait Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlar arasından uygun olarak seçilen optimum formülasyonun çözünürlük çalışması ve partisyon katsayısı analiz edilmiştir. Optimum formülasyonun morfolojik olarak yapısının görüntülenmesi amacıyla TEM cihazı kullanılmıştır. Optimum seçilen formülasyon için DSC ve FTIR analizleri yapılmıştır. Ayrıca formülasyonların *in vitro* çözünme hız tayini %0,2'li Tween 80'li pH 6,8 tampon ortamında gerçekleştirilmiştir.

2.12.1. Optimum Formülasyona ait Çözünürlük Tayini

Çözünürlük çalışmaları etkin maddenin ilgili ortamdaki çözünürlüğünü araştırmak için kullanılmaktadır (USP, 2021). Hazırlanan kuersetin fitozom formülasyonlarının tampon ortamlarındaki çözünürlük değerlerinin saf kuersetine oranla oral alımdan sonraki değişimini incelemek amacıyla vücut sıcaklığındaki analizi yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı saf kuersetine oranla formülasyonun çözünürlüğe olan etkisini araştırmaktır.

1 mg/ml tampon ortamlarına aşırı miktarda olacak şekilde ilave edilen fitozom formülasyonlarının ilave edilmesiyle olan dispersiyon ortamındaki çözünürlüğü, çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca incelenmiştir. 100 rpm olan dönü hızında 37 °C'deki ortamdan belirli aralıklarla çekilen numunelerde 0,45µm'lik rejenere selüloz asetat filtrelerden süzülmüştür. Elde edilen süzüntüler spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Deneyler üç kez olacak şekilde tekrarlanmıştır.

2.12.2. Optimum Formülasyona ait Partisyon Katsayısı Tayini

Saf kuersetine oranla biyolojik membranlardaki davranışını nasıl taklit edeceğini göstermek amacıyla yapılan bu çalışmada partisyon katsayısının değişimi gözlenmesi amaçlanmıştır. 0,5 mg kuersetine eşdeğer olacak şekilde fitozom formülasyonu tartılmıştır. 50 ml pH 6,8 tampon ortamına ilave edilmiş, üzerine 50 ml oktanol çözeltisi eklenmiştir.

Çalkalamalı inkübatörde 100 rpm'de 37°C' de 24 saat boyunca çalkalanmıştır. 24. Saatin sonunda numuneler toplanmış ve spektrofotometrede ölçümleri alınmıştır.

2.12.3. Optimum Formülasyona ait DSC Termogram Grafikleri

Alüminyum pan içerisine konulan kuersetin fitozom formülasyonu için hem fiziksel hem fosfotidilkolin ile karşılaştırma yapacak şekilde DSC termogramları çekilmiştir. Bu sayede olası girişimleri gözlenmesi amaçlanmıştır. Formülasyona ait termal özellikler, TA Instruments DSC 250 cihazı ile incelenmiştir. 10 mg ağırlığındaki numune alüminyum pan içerisine yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Numuneler 20 °C/dk hızda doğrusal ısıtma olacak şekilde 25-400 °C aralığındaki termogram değerleri tayin edilmiştir.

2.12.4. Optimum Formülasyona ait FTIR Analizleri

Hazırlanan formülasyon oda şartlarında bekletilmiştir ve fosfotidilkolin ile birlikte FTIR spektroskopisi ölçümleri için Diamond ATR (Attenuated Total Reflectance) ilavesi olan cihaz kullanılmıştır (Agilent Cary 630-FTIR, Agilent Technologies). Örnek numuneler FTIR spektrumları incelenmesine olanak sağlamaktadır. Kuersetin toz halde cihazın elmas kristal yapıdaki özel bölmesine yerleştirilir, hazırlandıktan sonra 4000-400 cm-1 dalga boyu aralığındaki FTIR spektrum analizleri gerçekleştirilir.

2.12.5. Optimum Formülasyona Ait XRD Analizi

Optimum formülasyon için kristal yapıda olan özelliklerini belirlenmesinde faydalı olması amacıyla XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Malvern Panalytical Empyrean Nano cihazı kullanılmıştır. Formülasyon kısa bir süre için formülasyon sıcaklığını geçmeyecek şekilde etüvde kurutulmuş ve analiz edilmeden önce bir lam üzerine film tabakası haline getirilmiş ve analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.12.6. Optimum Formülasyona ait TEM Görüntüleri

Fitozom formülasyonun TEM ile çekilen görüntüleri için JEOL 1220 JEM marka cihaz kullanılmıştır. Bu sayede fitozom yapısının yüzey morfolojik yapısı incelenmiştir. Uygun gridlere yeteri miktarda konulan fitozom formülasyonu konularak numuneler hazırlanmıştır.

2.12.7. Optimum Formülasyona ait Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta potansiyeli Tayini

Optimum formülasyona ait yapılan bu çalışmada partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli için Malvern ZetaSizer (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Bu ölçümler sayesinde oluşturulan formülasyonların tekrarlanabilir olup olmadığı incelenmiş ve partiküllerin karakterizasyonu incelenmiştir.

2.12.8. Optimum Formülasyona ait *İn Vitro* Salım Çözünme hızı Çalışmaları

Kuersetin fosfolipit kompleks yapısı olan fitozom yapıları için, *in vitro* şartlarda etkin madde salımın tayini için diyaliz membran metodu ile gerçekleştirilmiştir. Diyaliz membranlar (Sigma, cut-off 12000 Da) bir gün süresince ultra saf suda bekletilmiştir. Salım yapılacak ortam çözeltisi ile yıkanmıştır. Formülasyonlar belirli oranlarda bölünerek 20 mg kuersetine eşdeğer içeren formülasyonlar olarak 2 ml %0,2'lik Tween80'li pH 6,8 fosfat tamponda disperse edilerek diyaliz membranlara konulmuş ve membranlar klipsler ile kapatılmıştır. Diyaliz membranlar 100 ml pH 6,8 tamponu içeren cam kavanozlara konulmuştur (n=3).

Cam kavanozların sıcaklığı 37 ± 0,5 °C'ye ve çalkalama hızı 100 rpm'e sabitlenmiş olan çalkalamalı inkübatöre konulmuştur. Belirlenen zaman aralıklarında (60., 120., 180., 240., 300., 360., 480. dakikaları ve 24. Saat süresi) ortamdan 1 ml numune alınmıştır. Yerine aynı sıcaklıkta ve miktarda taze ortam çözeltisi ilave edilmiştir.

Numuneler 0,45 µm rejenere selüloz asetat filtreden geçirilerek seyreltme işlemi yapılmış hali ile spektrofotometrede analizi gerçekleştirilmiştir. Deneyler her bir formülasyon için üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlardan açığa çıkan kuersetin yüzde miktarları zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve etkin madde salım profilleri elde edilmiştir.

Ayrıca kuersetinin toz halinin ve kuersetin kompleks piyasa preparatının da *in vitro* çözünme hızı çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

2.12.9. Etkin Madde İçin Formülasyondan Salım Kinetik Modellerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan ve optimum olarak seçilen formülasyon %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 fosfat tamponu salım ortamında etkin maddenin açığa çıkışının benzerlik gösterdiği salım kinetik modelleri Microsoft Excel programında DDsolver program eklentisi ile analiz gerçekleştirilmiştir. İncelenen salım kinetikleri sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Korsmayer-Peppas, Hixson-Crowell ve Weibull kinetikleridir.

2.13. Stabilite Çalışmaları

Farmasötik ürünlerin stabilite ve güvenlik profillerini incelemek amacıyla stabilite çalışmaları yapılmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında belirlenen optimum formülasyon için iki farklı şekilde stabilite çalışması yürütülmüş olup aşağıda belirtilmiştir.

Hazırlanan formülasyonun saklama koşullarındaki stabilitelerini incelemek amacıyla oda ve buzdolabı şartlarındaki (1 ay) durumları incelenmiştir (Çizelge 2.3). Ayrıca formülasyonun ve buna ilaveten etkin maddenin gastrointestinal sistem içerisindeki stabilitesini incelemek amacıyla yapılan SGF ve SIF çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 2.3. Stabilite koşulları (ICH Q1A)

Parametreler / Koşullar	Nem	Sıcaklık
Oda	% 60 BN ± % 5 BN*	25 °C ± 2°C
Buzdolabı	-	5 °C ± 3°C

*BN= bağıl nem

2.13.1. Optimum Formüle ait Simüle Mide (SGF) ve Simüle Bağırsak (SIF) Ortamlarındaki Stabilite Çalışmaları

Kuersetin, oral olarak yoldan uygulandığında GİS'te farklı bölgelerinden geçmektedir. Bu esnada kuersetinin ve formülasyonun başlangıç stabilitesini etkileyebilecek

farklı enzimatik ve pH koşullarına maruz kalmaktadırlar. Formülasyon için bu koşullar altındaki mevcut stabilitesini değerlendirmek için simüle çözeltiler hazırlanmıştır. Formülasyonun ve kuersetinin stabiliteleri *in vitro* olarak simule svılardaki stabiliteleri tayin edilmiştir. Bu amaçla simüle mide sıvısı (pH 1,2) ve simüle bağırsak sıvısı (pH 6,8) ortamları hazırlanmıştır.

Simüle mide sıvı ortamına enzim olarak pepsin enzimi, simüle bağırsak sıvı ortamına ise pankreatin enzimi ilave edilmiştir. 2,5 mg kuersetin ve formülasyon numuneleri 10'ar ml simüle mide sıvı ortamı içinde 37 °C'de 2 saat ve 10'ar ml simüle bağırsak sıvısı ortamı içinde 37 °C'de 6 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu süreler etkin madde ve formülasyonun mide ortamında ve bağırsak ortamında tahmini kalış süresi göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Bu süre sonunda enzimatik faaliyeti durdurmak amacıyla her bir numuneye önceden hazırlanmış olan ayarlı trifloro asetik asit çözeltisi ilave edilmiştir. 30 dakika santrifüj işlemi 5000 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süpernatantlar 0,45µm'lik filtreden geçirilmiş ve analiz için spektrofotometrede analizleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler üçer paralel olacak şekilde yürütülmüştür.

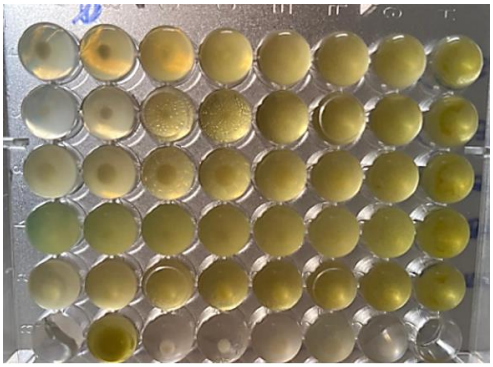
2.13.2. Oda Sıcaklığı ve Buzdolabı Ortamlarındaki Stabilite Çalışmaları

Optimum formülasyon için seçilen F-17 formülasyonun stabilite tayini için buzdolabı koşullarında 5 °C ± 3°C'de ve oda koşullarında 25 °C ± 2°C, % 60 BN ± % 5 BN (bağıl nem) koşullarında uygun koşullarda 1 ay boyunca bekletilmiştir. Formülasyonların başlangıçta ve 1. ay sonunda enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü değeri, büyüklük dağılımı değeri ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Analizler 3 paralel halinde yapılmıştır.

2.14. Kuersetin ve Optimum Formülasyon İçin Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Testi CLSI kılavuzuna uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yürütülmüştür (CLSI, 2012). Bu amaçla kuersetin (Şekil 2.3), formülasyon (Şekil 2.4) ve fosfotidilkolin %25'lik dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözünerek stok hazırlanmıştır. Ardından mikroplaklarda Mueller Hinton Broth besiyerinde 100µl hacimlerde seri dilüsyonları yapılmıştır. Antibakteriyel aktivite testlerinde 2,75 mg kuersetin ve aynı miktarda kuersetin fitozom formülasyonları hesaplanarak stok

hazırlanmıştır. 2,75 mg/ml stoktan seyreltilerek seri seyreltmeler hazırlanmıştır. Çalışma 687,5-5,4 µg/ml aralığında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3. Kuersetin mikroplak çalışması

Staphylococcus auresus ATCC 29213, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 ve *Klebsiella pneumoniae ATCC 13883* suşlarının Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerinde elde edilen taze kültürleri steril fizyolojik tuzlu su içinde 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanmıştır.

Bakteri süspansiyonları 1/100 oranında seyreltilerek kuyucuklara 100 µl hacimlerde eklenmiştir. Üreme kontrolü olarak bakteri süspansiyonları; antibakteriyel ajan içermeyen, sadece besiyeri içeren kuyucuklara inoküle edilmiştir. Sterilite kontrolü olarak ise sadece besiyeri içeren kuyucuk eklenmiştir. Mikroplakalar 37°C'de inkübasyona bırakılıp 24-48 saatlik inkübasyon sonunda görsel gözlem ile üreme görülmeyen en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir. Deneyler üç paralel yürütülmüştür. Çalışmada standart antibiyotik olarak siprofloksasin kullanılmıştır. Çözücü ve fosfotidilkolin kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.4. Kuersetin fitozom mikroplak çalışması

Çalışılan suşlar sırasıyla Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Bunlar sırasıyla;

a-*Staphylococcus aureus*, ATCC 29213 (Gram pozitif)

b-*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram pozitif)

c-*Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negatif)

d-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram negatif)

e-*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (Gram negatif)

f-Kontrol olarak sınıflandırılmıştır.

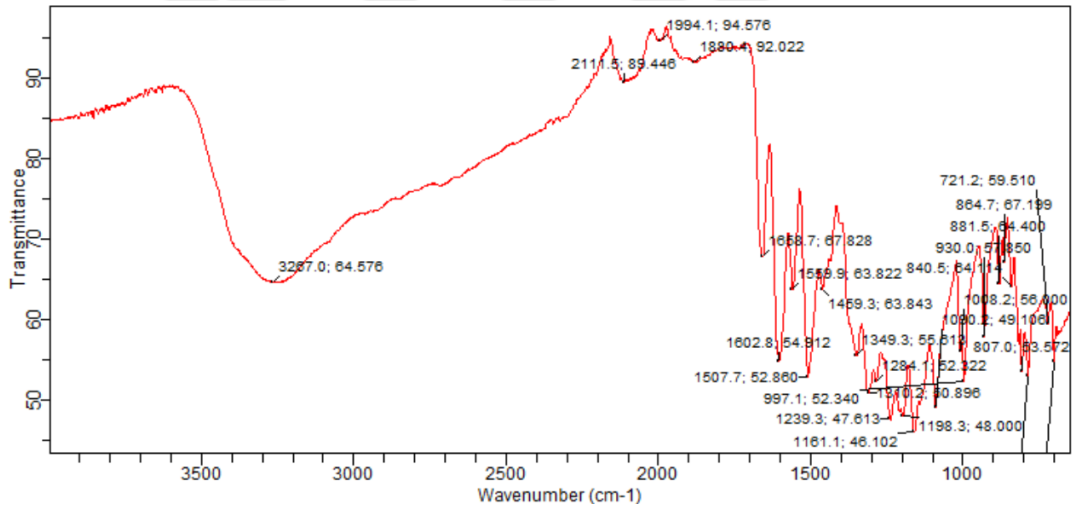
3. BULGULAR

3.1. Kuersetine ait Fizikokimyasal Özellikler

Kuersetine ait fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi için çeşitli analizler yapılmıştır. FTIR spektrumu incelenmiş, UV spektrofotometresindeki maksimum absorbans verdiği değer belirlenmiş, DSC termogramı alınmış, SEM görüntüsü incelenmiş ve XRD ile ışık kırılımı incelenmiştir.

3.1.1. Kuersetine Ait FTIR Analizine ait Bulgular

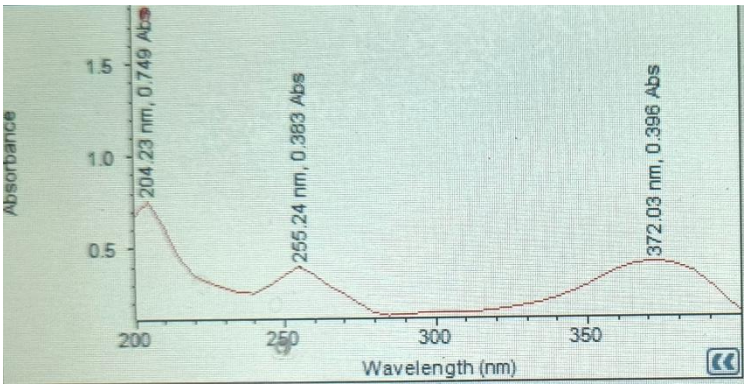
Kuersetine ait FTIR analizi Bölüm 2.4.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Etkin maddenin sahip olduğu fonksiyonel gruplar bant halinde Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kuersetin FTIR spektrumları

3.1.2. Kuersetine ait UV Analizine ait Bulgular

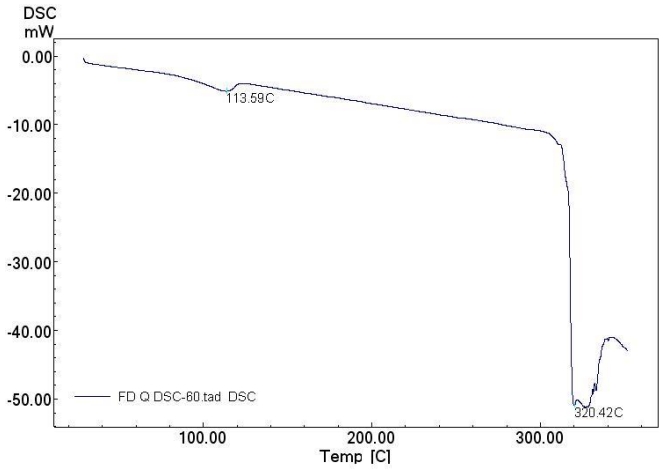
Kuersetinin miktar tayini için tampon çözeltisi içerisindeki 200-400 nm dalga boyu aralığındaki dalga boyu aralık grafiği Şekil 3.2'de verilmiştir. Bundan sonra yapılacak bahsedilecek olan deney işlemleri belirlenen 372 nm olarak kabul edilecektir. Elde edilen pikler Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Kuersetin UV spektrumu

3.1.3. Kuersetinin DSC Analizine ait Bulgular

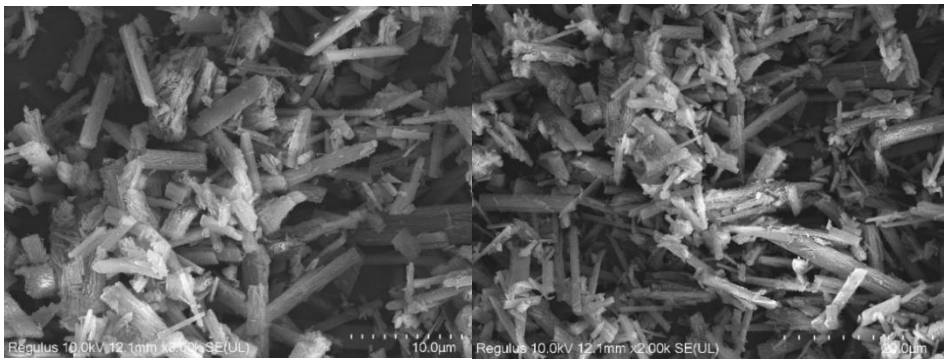
Kuersetine ait DSC termogram piklerini elde etmek için yapılan çalışmalar Bölüm 2.4.3'te açıklanmıştır. Elde edilen termogram Şekil 3.3'te gösterilmiştir. 320 °C'de kuersetin pik vermiştir.



Şekil 3.3. Kuersetine ait DSC termogramı

3.1.4. Kuersetinin SEM Analizine ait Bulgular

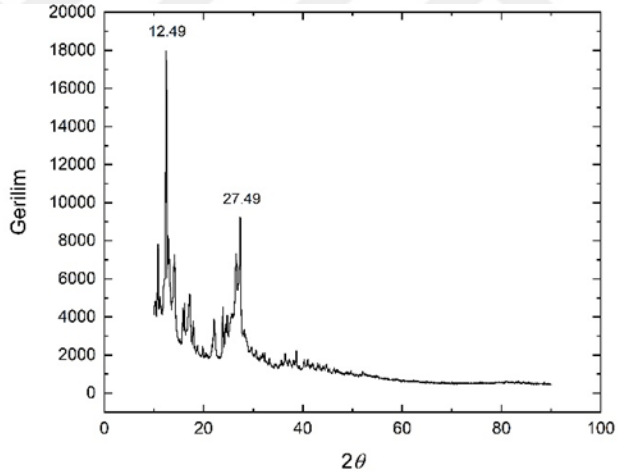
Kuersetine ait yapılmış SEM analizi Bölüm 2.4.4'te anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Etkin maddeye ait SEM görüntüleri Şekil 3.4'te olduğu gibidir. Kuersetinin ince çubuk görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 3.4. Kuersetine ait SEM görüntüleri

3.1.5. Kuersetinin XRD Analizine ait Bulgular

Kuersetine ait yapılan ışık kırılımı analizleri Bölüm 2.4.5'te anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Toz haldeki etkin maddeye ait kırılım değerleri 12.49 ve 27.49 2θ olarak bulunmuş ve Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

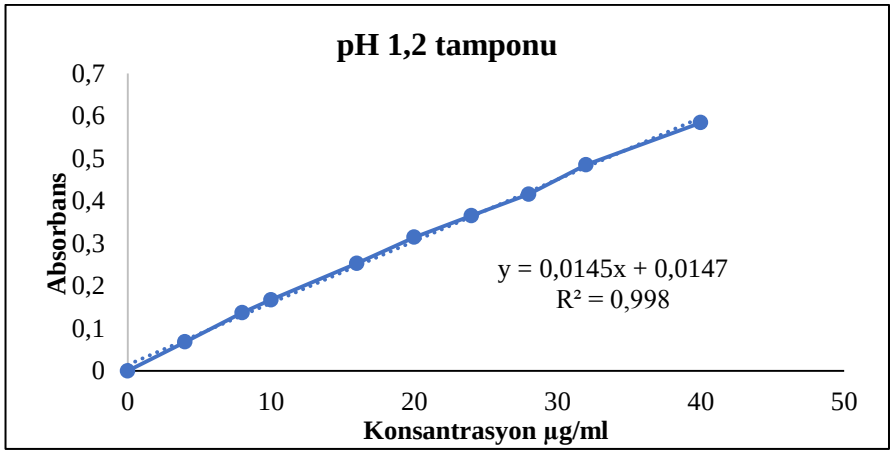


Şekil 3.5. Kuersetin XRD grafiği

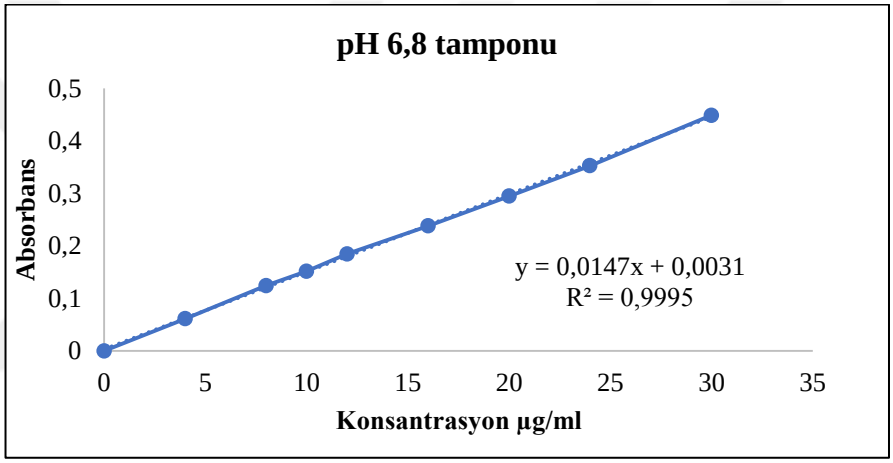
3.2. Kuersetinin Miktar Tayini Çalışmaları

3.2.1. Kuersetinin Kalibrasyon Doğru Grafiklerinin Oluşturulması

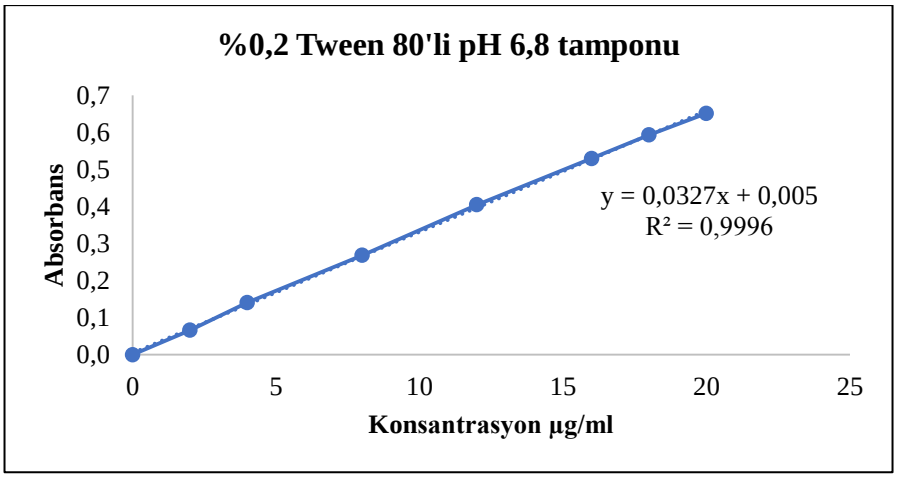
Kuersetinin miktar tayini çalışmaları spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bunun için, pH 1,2 (Şekil 3.6), pH 6,8 (Şekil 3.7) ve %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ortamında (Şekil 3.8) kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Bu grafiklerin eldesi için kuersetinin 100 µg/ml'lik çözeltilerinden hareketle hazırlanmıştır ve uygun seyreltmeler yapılarak 372 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.



Şekil 3.6. pH 1,2 tamponu kalibrasyon grafiği



Şekil 3.7. pH 6,8 tamponu kalibrasyon grafiği



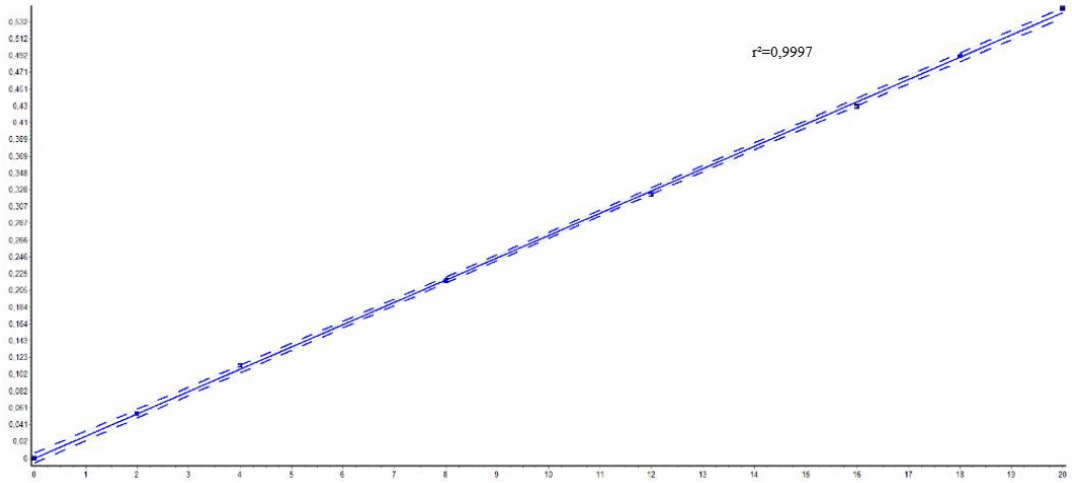
Şekil 3.8. %0,2'lik Tween 80 pH 6,8 tamponu kalibrasyon grafiği

3.2.2. Kuersetinin Analitik Validasyonuna ait Bulgular

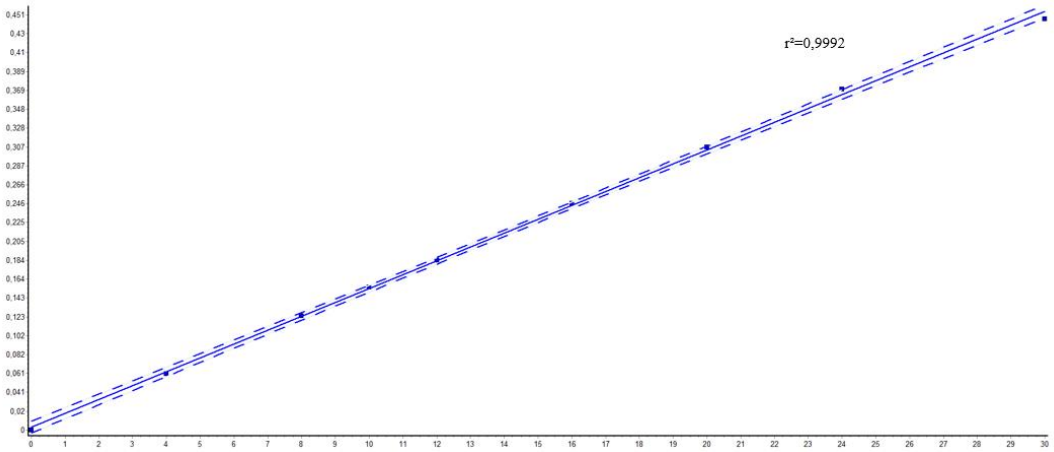
Kuersetine ait analitik validasyon çalışmaları ICH Q2 R1 kılavuzu dikkate alınarak hazırlanmıştır. Bölüm 2.6'da belirtildiği üzere analitik validasyon için gerekli spesifikasyonlar aşağıda sonuçları ile birlikte belirtilmiştir.

3.2.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Kuersetinin pH 6,8 tampon ortamında ve %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ortamındaki doğrusallık grafikleri hazırlanırken 100 µg/ml'lik stok çözeltilerinden hareketle hazırlanmıştır. Bu doğrusallık çalışmalarının sonucunda elde edilen doğru grafiklerinden doğrusallık ve aralığı veri çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen grafikler Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da belirtilmiştir. Grafikten elde edilen r^2 değerinin 1'e yakın olması doğrusal olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.9. %0,2 Tween 80'li pH 6,8 doğrusallık grafiği



Şekil 3.10. pH 6,8 tamponu doğrusallık grafiği

Kuersetinin pH 6,8 ve %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ortamındaki doğrusallık çalışmalarına ait istatiksel veriler ise Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan ortamların doğrusallık istatistikleri

Doğrusallığa ait veriler	pH 6,8	%0,2'lik Tween 80'li pH 6,8
Eğim	0,01505	0,02719
Eğimin standart hatası	0,0001614	0,000248
Eğimin % 95 güven aralığı	0,1467-0,01543	0,02669-0,02769
Kesişim	-0,2004	-0,0004058
Kesişimin % 95 güven aralığı	-0,003290-0,009321	-0,006147-0,006172
Regresyon doğrusundan olan Sapmalar için standart hatalar (Sy.x)	0,004413	0,004138
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9992	0,9997

3.2.2.2. Doğruluk ve Geri elde

Kuersetinin %0,2'lik Tween 80 içeren pH 6,8 tampon ortamındaki ve pH 6,8 ortamındaki düşük, orta ve yüksek konsantrasyon değerlerindeki konsantrasyon değerlerinde analiz yapılmıştır. %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ortamı için konsantrasyon değerleri sırasıyla 4,12,20 µg/ml iken pH 6,8 ortamı için konsantrasyon değerleri sırasıyla 8,16,24 µg/ml'dir.

Analiz sonucu için yüzde geri elde değeri, standart sapma değeri (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) değeri hesaplamıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'de gösterilmiştir. Analizler spektrofotometrik yöntemle 372 nm'de tayin edilmiştir.

Çizelge 3.2. %0,2 Tween 80 pH 6,8 'li ortam doğruluk analizleri

4 µg/ml			**12 µg/ml**			**20 µg/ml**		
Abs.	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Abs.**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Abs.**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**
0,130	3,826	95,66	0,370	11,176	93,13	0,630	24,227	100,95
0,129	3,796	94,90	0,371	11,206	93,38	0,632	24,092	100,38
0,132	3,888	97,19	0,377	11,390	94,92	0,635	24,024	100,10
0,133	3,918	97,96	0,379	11,451	95,43	0,636	23,820	99,25
0,128	3,765	94,13	0,380	11,482	95,68	0,637	23,820	99,25
0,131	3,857	96,43	0,382	11,543	96,19	0,639	23,684	98,68
Ortalama		96,045	Ortalama		94,788	Ortalama		103,708
SS		1,307	SS		1,148	SS		0,499
BSS		1,361	BSS		1,211	BSS		0,481

Çizelge 3.3. pH 6,8 tamponu doğruluk analizleri

8 µg/ml			**16 µg/ml**			**24 µg/ml**		
Abs.	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Abs.**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**	**Abs.**	**C (µg/ml)**	**% Geri elde**
0,125	8,275	103,44	0,251	16,828	105,18	0,360	24,227	100,95
0,124	8,207	102,59	0,253	16,964	106,03	0,358	24,092	100,38
0,123	8,139	101,74	0,249	16,693	104,33	0,357	24,024	100,10
0,120	7,936	99,20	0,250	16,760	104,75	0,354	23,820	99,25
0,124	8,207	102,59	0,248	16,625	103,90	0,354	23,820	99,25
0,122	8,071	100,89	0,245	16,421	102,63	0,352	23,684	98,68
Ortalama		101,742	Ortalama		104,470	Ortalama		99,769
SS		1,386	SS		1,058	SS		0,773
BSS		1,362	BSS		1,013	BSS		0,775

3.2.2.3. Kesinlik

Oluşturulan miktar tayini yöntemlerinin kesinlik çalışmalarının Bölüm 2.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve farklı günlerde yapılan ara kesinlik çalışmaları değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında yapılan analizlerde %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ortamı için konsantrasyon değerleri sırasıyla 4,12,20 µg/ml iken pH 6,8 ortamı için konsantrasyon değerleri sırasıyla 8,16,24 µg/ml'dir. Analizler spektrofotometrik yöntemle 372 nm'de tayin edilmiştir. Analizlerin hesaplarının sonuçları arasında ortalama, standart sapma değeri (SS) ve % bağıl standart sapma değeri (BSS) sonuçları belirlenmiştir. Hesaplanan veriler sırasıyla Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. %0,2 Tween 80'li pH 6,8 tekrarlanabilirlik analizleri

C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)
4	3,643	12	12,247	20	19,290
4	3,520	12	12,186	20	19,259
4	3,551	12	12,155	20	19,229
4	3,490	12	12,094	20	19,137
4	3,459	12	12,064	20	19,106
4	3,459	12	12,033	20	19,076
Ortalama	3,520	Ortalama	12,130	Ortalama	19,183
SS	0,064	SS	0,074	SS	0,081
BSS	1,811	BSS	0,608	BSS	0,420

Çizelge 3.5. pH 6,8 tamponu tekrarlanabilirlik analizleri

C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)	C teorik (µg/ml)	C pratik (µg/ml)
8	7,936	16	16,760	24	24,567
8	8,004	16	16,828	24	24,635
8	7,868	16	16,693	24	24,703
8	7,936	16	16,625	24	24,906
8	7,800	16	16,489	24	25,178
8	7,868	16	16,421	24	25,246
Ortalama	7,902	Ortalama	16,636	Ortalama	24,872
SS	0,065	SS	0,144	SS	0,262
BSS	0,822	BSS	0,863	BSS	1,054

Ara Kesinlik

Ara kesinlik çalışmaları kapsamında yapılan çalışmalarda %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ortamı için konsantrasyon değerleri sırasıyla 4,12,20 µg/ml iken pH 6,8 ortamı için konsantrasyon değerleri sırasıyla 8,16,24 µg/ml'dir. 2'şer gün için 6 adet ölçüm alınmış spektrofotometrik yöntemle analizi 372 nm'de gerçekleştirilmiştir. Analizlerin hesaplarının sonuçları arasında ortalama, standart sapma değeri (SS) ve % bağıl standart sapma değeri (BSS) sonuçları belirlenmiştir. Hesaplanan veriler Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Ara kesinlik analizleri

Analiz Ortamı	**%0,2 Tween 80'li pH 6,8**			**pH 6,8**		
C teorik (µg/ml)	4 (µg/ml)	12 (µg/ml)	20 (µg/ml)	8 (µg/ml)	16 (µg/ml)	24 (µg/ml)
1. Gün	3,673	12,400	19,198	8,343	17,100	24,567
	3,643	12,339	19,168	8,275	16,964	24,635
	3,582	12,308	19,137	8,275	17,032	24,703
	3,582	12,308	19,106	8,207	17,032	24,906
	3,551	12,278	19,076	8,139	16,964	25,178
	3,520	12,247	19,076	8,071	16,896	25,246
2. Gün	3,582	12,186	18,984	7,936	16,693	24,838
	3,551	12,155	18,953	8,004	16,625	24,703
	3,520	12,125	18,923	7,936	16,557	24,567
	3,520	12,064	18,953	7,936	16,557	24,499
	3,459	12,033	18,892	8,004	16,489	24,431
	3,428	12,002	18,800	7,868	16,421	24,363
ORTALAMA	3,551	12,204	19,022	8,083	16,777	24,720
SS	0,066	0,124	0,117	0,154	0,234	0,266
BSS	1,863	1,016	0,617	1,904	1,393	1,076

3.2.2.4. Özgünlük

Bölüm 2.6'da anlatıldığı gibi özgünlük çalışmaları kapsamında yapılan analizlerde kuersetinin fosfotidilkolin ile 372 nm'de aynı dalga boyu için herhangi bir ortak pik vermediği gözlenmiştir.

3.2.2.5. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırları (LOQ) Belirlenmesi

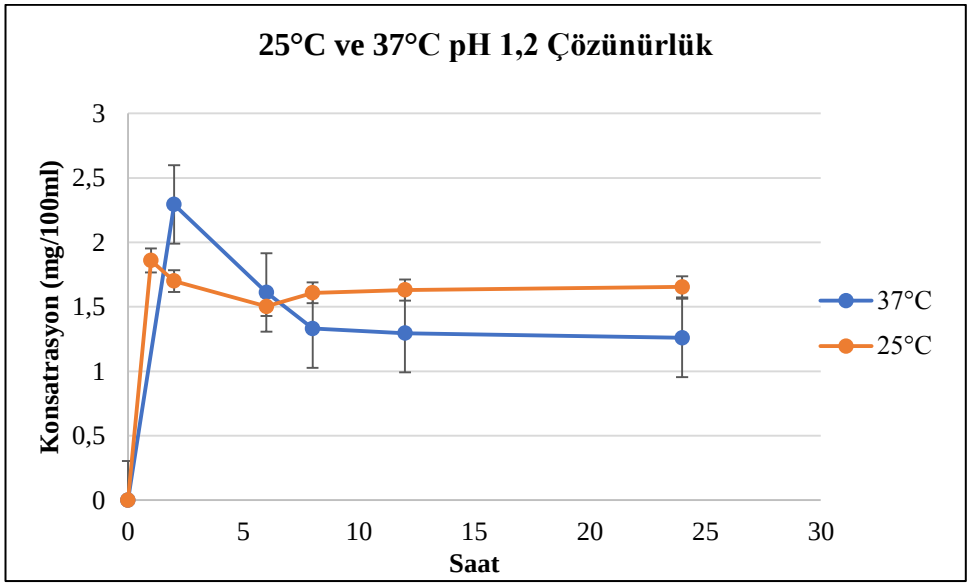
Kuersetin için %0,2'lik Tween 80'li pH 6,8 ve pH 6,8 LOD ve LOQ değerleri Bölüm 2.6'da anlatıldığı gibi analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda Eşitlik 2.1 ve Eşitlik 2.2 kullanılarak hesaplamalar elde edilmiş ve analiz sonuçları Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Teşhis ve tayin sınırı analizleri

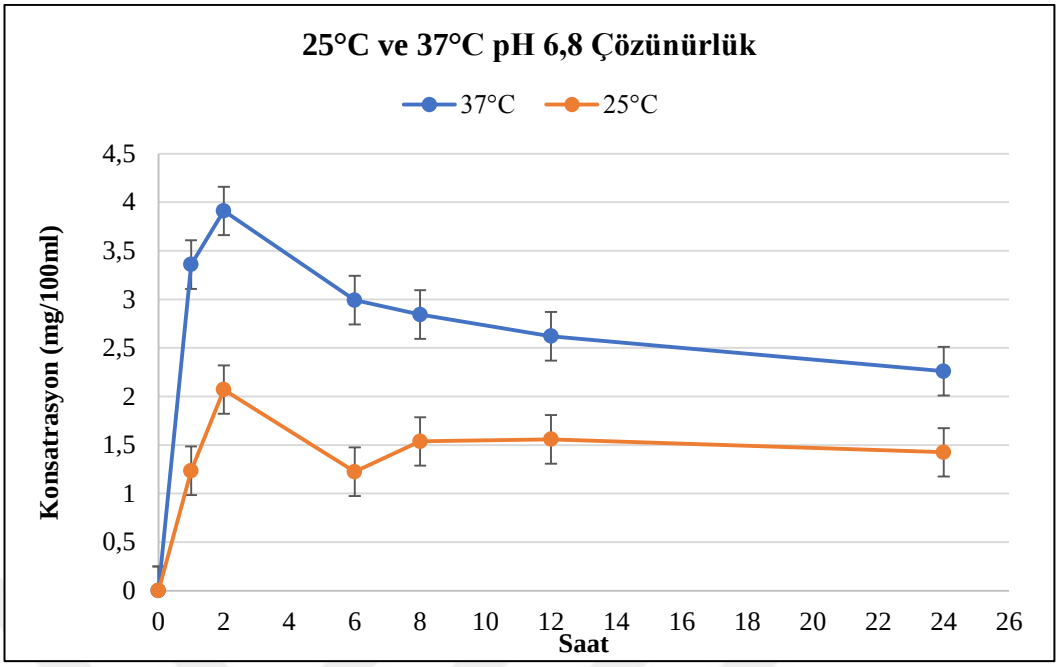
Ortam	%0,2 Tween 80 'li pH 6,8	pH 6,8
Teşhis sınırı LOD (µg/ml)	0,5177	0,2279
Tayin sınırı LOQ (µg/ml)	1,5688	0,6907

3.3. Kuersetin Çözünürlük Çalışmalarına ait Bulgular

Kuersetinin çözünürlüğünün zayıf olmasından dolayı yapılan çözünürlük çalışmaları Bölüm 2.7'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. pH 1.2 ve pH 6.8 için yapılan çözünürlük çalışmalarının sonuçları 25°C ve 37°C'ler için sırasıyla Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de olduğu gibi gösterilmiştir.



Şekil 3.11. 25°C ve 37°C pH 1,2 çalışmalarına ait çözünürlük-zaman grafiği



Şekil 3.12. 25°C ve 37°C pH 6,8 çalışmalarına ait çözünürlük-zaman grafiği

3.4. Kuersetin Partisyon Katsayısı Çalışmalarına ait Bulgular

Biyolojik membranlardan geçişi temsil etmesi özelliğiyle partisyon katsayısı bitkisel kaynaklı bileşikler için önem arz etmektedir. Çözünürlüklerinin yapay ya da doğal kaynaklı maddelere bağlı olarak değişmesi ya da metabolitinin varlığı gibi çeşitli nedenlerden kaynaklı olarak değişkenlik göstermesi partisyon katsayısında farklılıkların oluşmasına neden olmaktadır.

Kuersetinin partisyon katsayısı çalışmaları Bölüm 2.8'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Analizlerin sonucu spektrofotometrik yöntemle 372 nm'de ölçülmüştür. Hesaplamalar Eşitlik 2.3 kullanılarak belirlenmiştir. Kuersetinin partisyon katsayısı 1,76±0,5 bulunmuştur.

3.5. Kuersetinin Formülasyon Çalışmalarına ait Bulgular

Kuersetin fitozom çalışmaları kapsamında yapılan formülasyonlar Bölüm 2.9'da olduğu gibi hazırlanmıştır. Çizelge 2.1 de sunulan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri %40'ın altında olması nedeniyle optimum formül seçimi için bu çizelge değerlendirmeye alınmamıştır. Çizelge 2.2 de yer alan formülasyonlara ait partikül boyutu, PDI değeri, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği verileri Çizelge 3.8'de sunulmuştur.

Çizelge 3.8. Formülasyonlar çizelgesi (n=3) (Ortalama±SS)

Formülasyonlar	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
F-1	1401±87,58	0,540 ±0,102	0,467± 0,054	73,42
F-2	644,1± 45,72	0,391 ±0,058	-31,5 ±0,755	60,49
F-3	898,7± 137,3	0,625 ±0,075	-28,6 ±1,10	80,25
F-4	1473 ±173,5	0,447 ±0,023	-28,93 ±0,737	80,36
F-5	1041 ±48,01	0,325± 0,01	-0,264 ±0,626	67,09
F-6	1326 ±49,8	0,549 ±0,023	-29,3 ±1,55	54,77
F-7	1918 ±55,01	0,489 ±0,055	-30,8 ±0,416	76,97
F-8	591,6 ±22,18	0,407 ±0,032	-1,34 ±0,591	74,42
F-9	1204± 19	0,490 ±0,083	-28,23± 1,01	79,01
F-10	1061 ±95,97	0,414 ±0,017	-28,77± 1,11	41,46
F-11	1266 ±42,45	0,381 ±0,062	-22,2 ±0,853	70,61
F-12	636,7 ±166,5	0,817 ±0,086	-28,7 ±0,839	60,73
F-13	864,3 ±33,53	0,418 ±0,050	-31,5 ±-2,465	58,72
F-14	660,7 ±15,17	0,491 ±0,048	-28,3 ±-0,585	69,31
F-15	961,0 ±41,49	1,00	-27,5 ±-0,369	72,45
F-16	1014 ±114,7	0,465 ±0,078	-27,8 ±-2,179	74,99
F-17	1006 ±24,22	0,385 ±0,059	-26,5± 0,907	86,96
F-18	1388± 53	0,633 ±0,157	-26,3 ±0,379	79,36
F-19	839,5 ±12,78	0,329 ±0,015	-27,2 ±0,929	88,21
F-20	1036 ±7,506	0,545± 0,038	-22,7 ±2,02	68,99

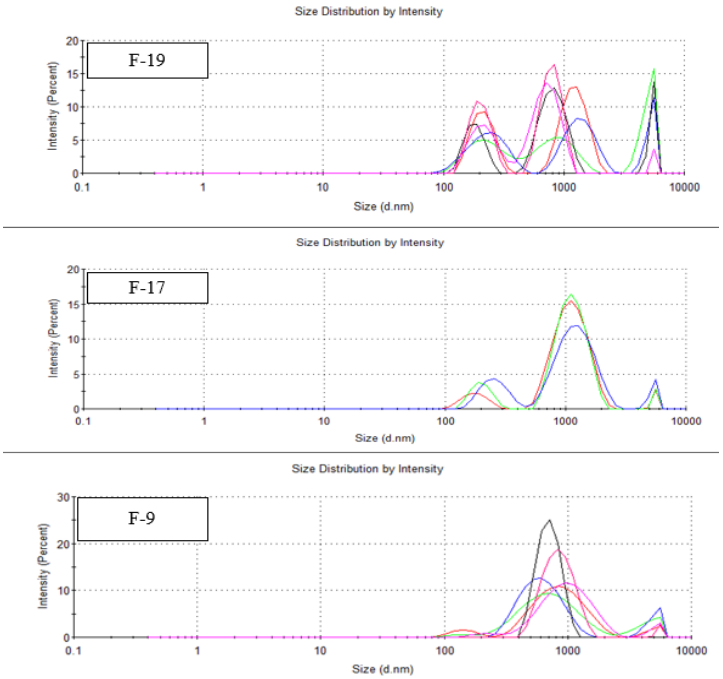
Çizelge 2.2'deki formülasyonlar değerlendirildiğinde, enkapsülasyon etkinliği %80 ve üzerinde, partikül boyutu yaklaşık 1000 nm, PDI değeri 0,6'dan aşağıda ve zeta potansiyeli -30 mV değerine yakın olan F-9, F-17 ve F-19 kodlu formüller seçilmiştir.

Bu formüller içerisinden optimum formülü seçmek için tekrar üretibilirlik çalışmaları yapılmıştır. Aynı zamanda bu 3 formülasyon için *in vitro* çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiş olup toplam 5 parametre değerlendirilerek optimum formül belirlenmiştir.

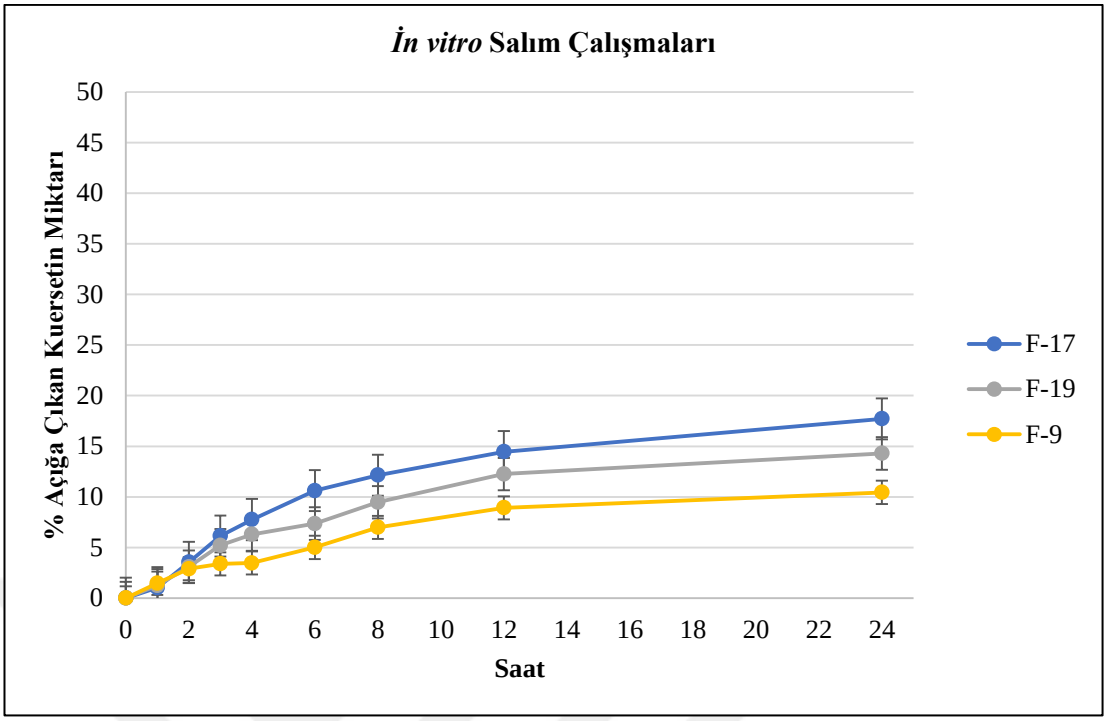
Bu formülasyonlar üç kere üretildikten sonra elde edilen verilerin ortalaması ve standart sapmaları Çizelge 3.9'da sunulmuştur. Partikül boyutlarının dağılımına ait grafikler ise Şekil 3.13'de gösterilmiştir. *İn vitro* salımlar ise Şekil 3.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. Formülasyonların üretim tekrarlanabilirlik analizleri(Ortalama±SS)

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm)	Zeta potansiyeli	PDI	Enkapsülasyon Etkinliği
F-9	1219±338,3	-27,8±2,72	0,976±0,048	%78,04±0,9
F-17	1039±110,1	-30,1±0,242	0,682±0,031	%84,26±1,2
F-19	861,6±168,2	-30,7±1,50	0,456±0,0,87	%85,32±0,5



Şekil 3.13. Tekrarlanabilirlik çalışması kapsamında partikül boyutu dağılımı gösterimi



Şekil 3.14. Formülasyonlara ait salım çalışmaları

3.6. Optimum Formülasyonun Belirlenmesi

Optimum formülün belirlenmesi için yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Bölüm 2.11.'de olduğu gibi bahsedilmiştir. Optimum formül olarak F-17 seçilmiştir.

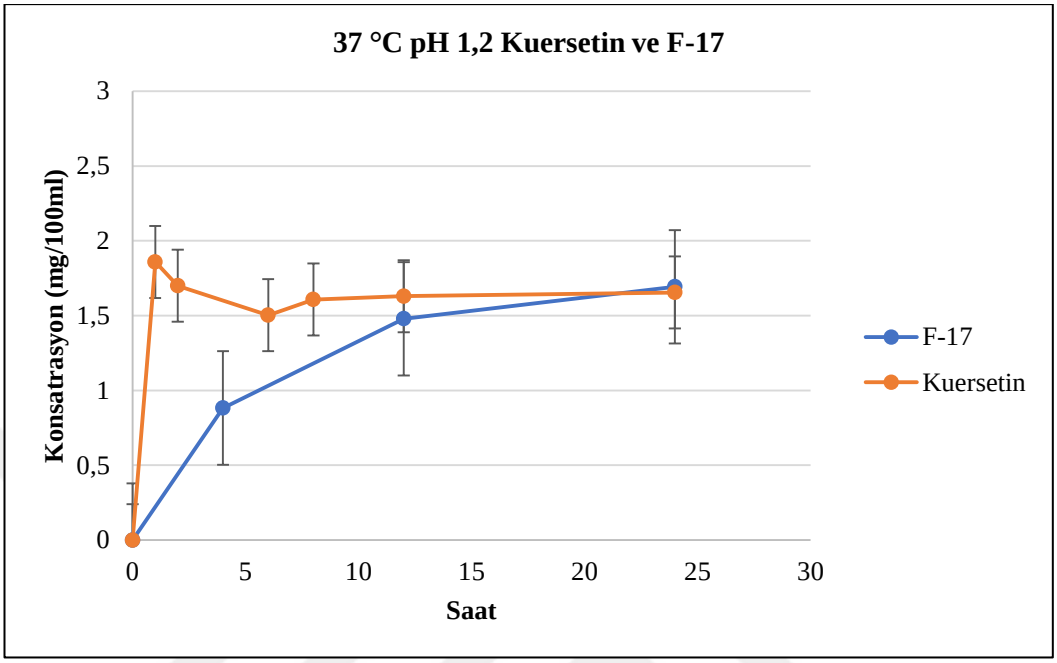
3.7. Optimum Formülasyona ait Karakterizasyon çalışmaları

F-17 formülasyonu için yapılan karakterizasyon çalışmaları Bölüm 2.12'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında sırasıyla çözünürlük çalışması, partisyon katsayısı tayini, DSC, FTIR, TEM, XRD, partikül özellkilerinin özellikleri, salım çalışmaları ve aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

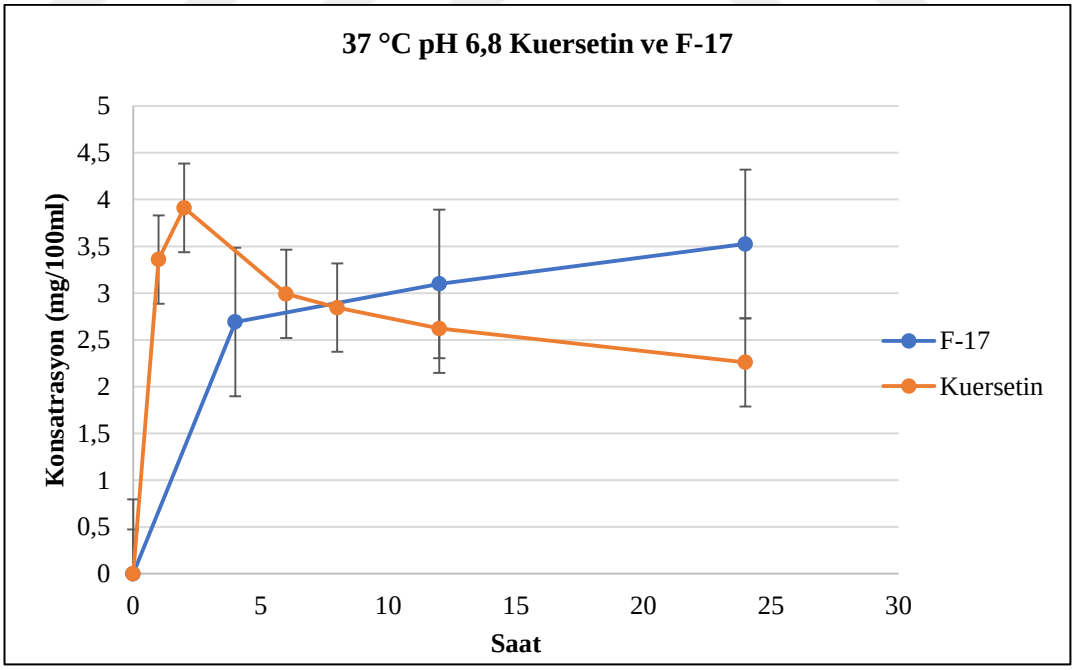
3.7.1. Optimum Formülasyona ait Çözünürlük Çalışmalarına ait Bulgular

F-17 kodlu formülasyona ait çözünürlük çalışmaları Bölüm 2.12.1'de anlatıldığı gibi tamamlanmıştır. 1mg/ml tampon ortamlarına aşırı miktarda olacak şekilde ilave edilen fitozom formülasyonlarının ilave edilmesiyle olan dispersiyon ortamında çözünürlük

ölçümleri için spektrofotometrik ölçümler 372 nm'de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da gösterilmiştir.



Şekil 3.15. 37°C'deki pH 1,2 için kuersetin ve F-17 formülünün çözünürlük grafiği



Şekil 3.16. 37°C'deki pH 6,8 için optimum formülün çözünürlük çalışması

3.7.2. Optimum Formülasyona ait Partisyon Katsayısı Çalışmalarına ait Bulgular

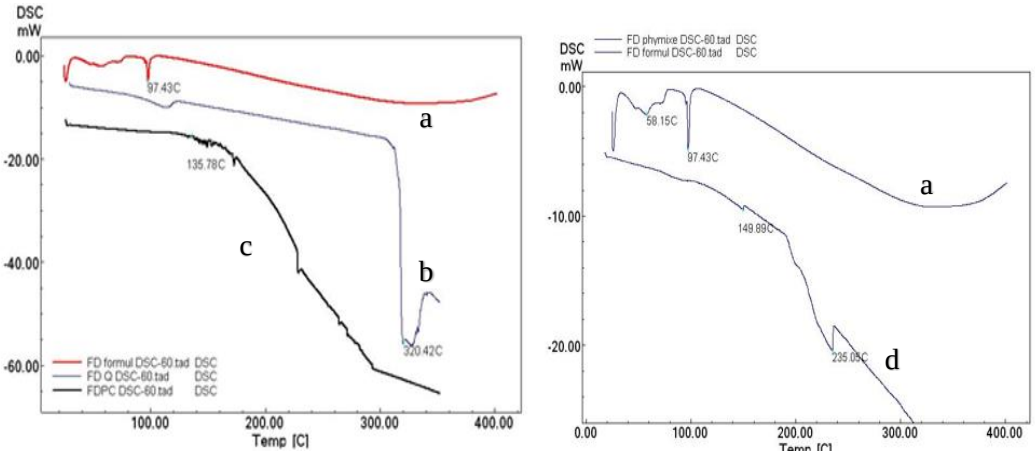
F-17 için partisyon katsayısı çalışmaları Bölüm 2.12.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. 0,5 mg kuersetine eşdeğer fitozom formülasyonu 50 ml pH 6,8 tamponuna ilave edilmiş ve 50 ml oktanol çözeltisi ile birlikte deney gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen kuersetin fitozom partisyon katsayısı 1,88±0,2 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. Partisyon katsayısı değerleri

Etkin madde ve Formülasyon	LogP Değeri
Kuersetin	1,76±0,5
F-17	1,88±0,2

3.7.3. Optimum Formülasyona ait DSC termogramları

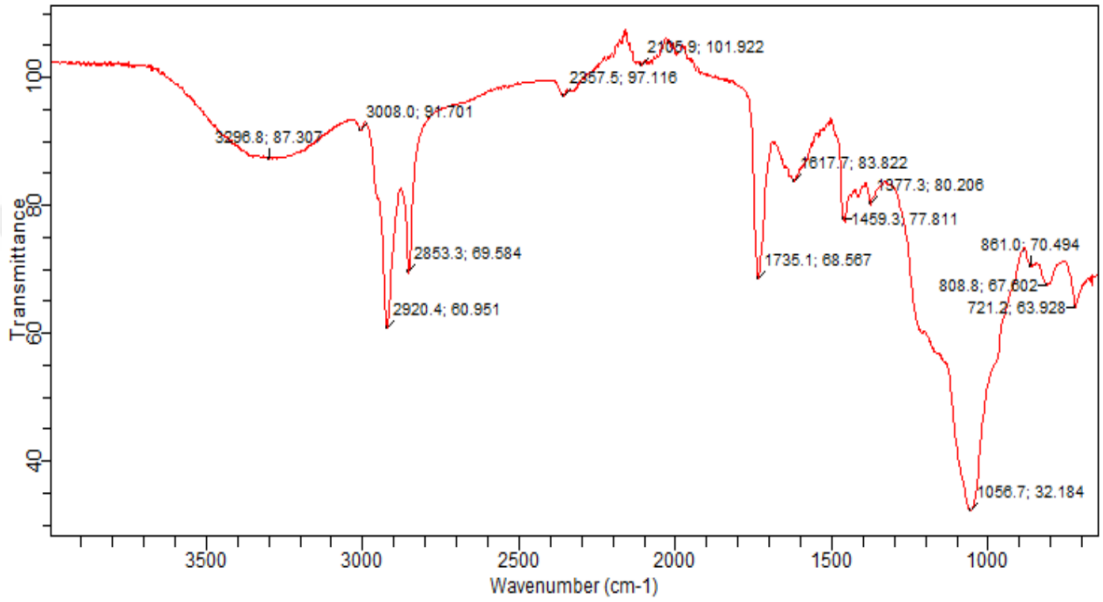
F-17'ye ait DSC termogramlarını elde etmek için gerçekleştirilen çalışmalar Bölüm 2.12.3'te anlatıldığı gibi tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.17'de gösterilmiştir.



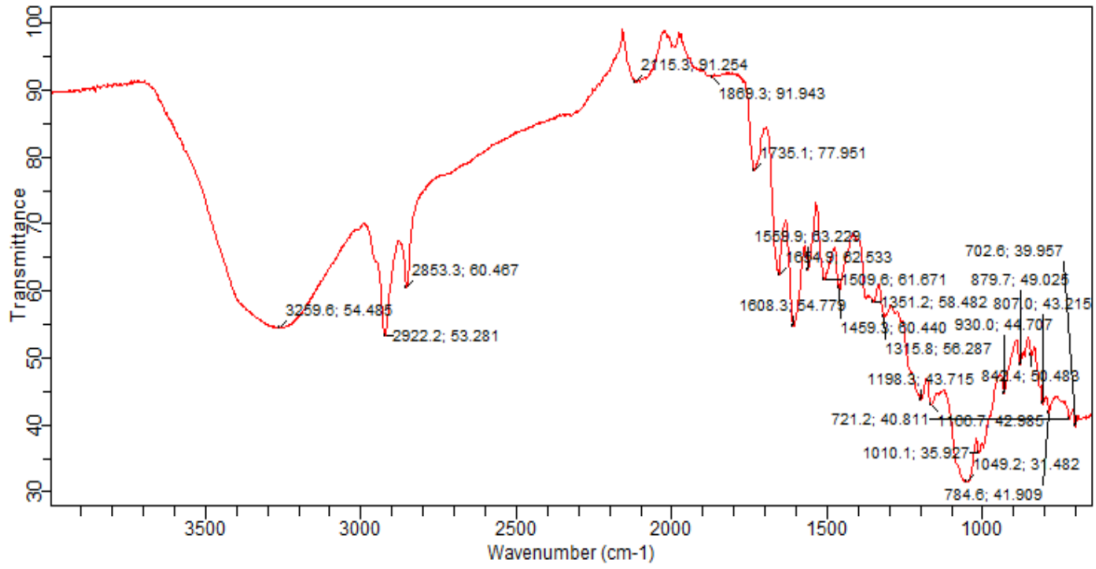
Şekil 3.17. DSC termogramları a)Formülasyon b)Kuersetin c) Fosfotidilkolin d)Fiziksel karışım

3.7.4. Optimum Formülasyona ait FTIR Analizleri

F-17'nin FTIR çalışmaları kapsamında yapılan çalışmalar Bölüm 2.12.4'te olduğu şekilde tamamlanmıştır. Optimum formülasyonu karşılaştırmak amacıyla fosfotidilkolinin de FTIR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.18). Formülasyona ait FTIR spektrumu Şekil 3.19'da gösterilmiştir.



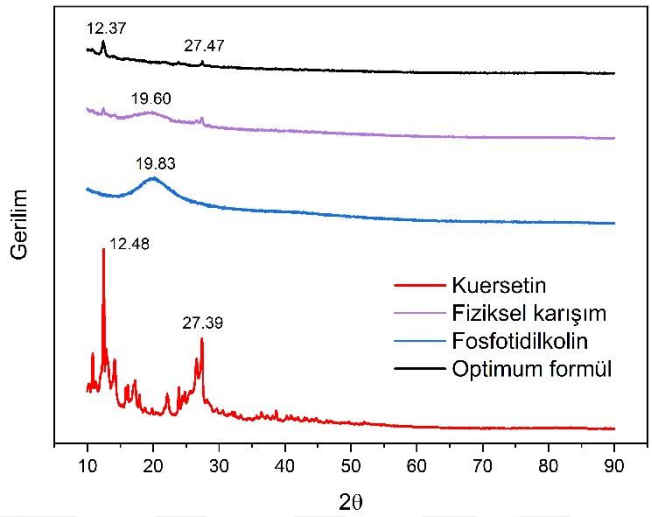
Şekil 3.18. Fosfotidilkolin FTIR analizi



Şekil 3.19. Formülasyon FTIR analizi

3.7.5. Optimum Formülasyona ait XRD Analizi

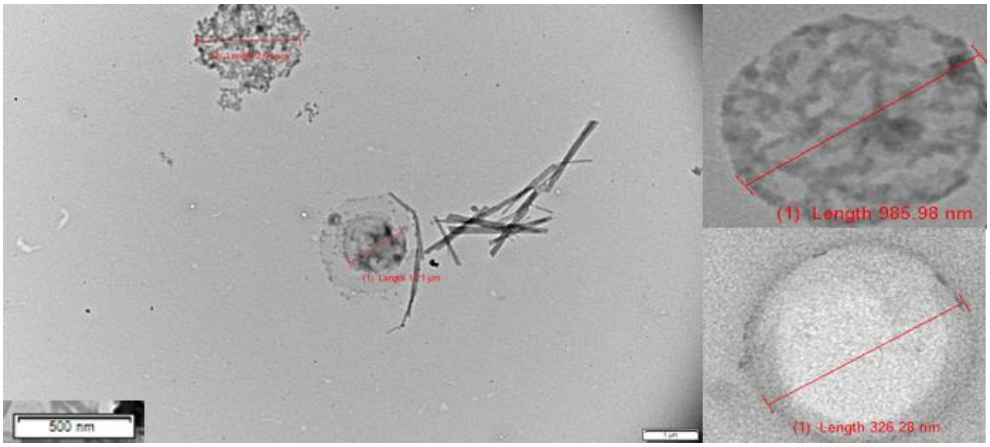
F-17'ye ait XRD analiz çalışmaları Bölüm 2.12.5'te anlatılmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda elde edilen *2θ* değerine karşılık gelen gerilimler Şekil 3.20'de gösterilmiştir.



Şekil 3.20. Optimum formül karşılaştırmalı XRD analizleri kırmızı kuersetin, mavi fosfotidilkolin, mor fiziksel karışım, siyah optimum formül

3.7.6. Optimum Formülasyona ait TEM Görüntüleri

F-17'ye ait TEM görüntüleri Bölüm 2.12.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 3.21'de gösterilmiştir. Elde edilen görüntülerde fitozom yapılar görünmektedir.



Şekil 3.21. Optimum formül TEM görüntüleri

3.7.7. Optimum Formülasyona ait *İn Vitro* Salım Çözünme hızı Çalışmalarına ait Bulgular

F-17'ye ait in vitro salım çözünme hızları çalışmaları kapsamında yapılan çalışmalar Bölüm 2.12.8'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmaları kapsamında optimum formül olan F-17'ye ilave olarak piyasa preparatı ve saf kuersetin değerlendirilmiştir. Tüm salım çalışmaları aynı koşullar altında yapılmış ve yapılan çalışmaların sonucu Şekil 3.22'de anlatıldığı gibi tamamlanmıştır.

3.7.8. Optimum Formülasyona ait Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

F-17'ye ait salım kinetiklerinin sonuçları Microsoft Excel programının DDSolver eklentisi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11'da gösterilmiştir.

Çizelgede yer alan salım kinetikleri için olan kısaltmaların açıklaması:

k_r^0: Sıfır derece salım kinetik profili hız sabiti (mg/sa)

k_r^1: Birinci derece salım kinetik profili hız sabiti (sa^{-1})

k_h: Higuchi salım kinetik profili için salım hız sabiti($sa^{-1/2}$)

k_p: Korsmeyer Peppas kinetik profili için salım hız sabiti (sa^{-1})

k_{HC}: Hixson Crowell kinetik profili için salım hız sabiti($sa^{-1/2}$)

r^2: Determinasyon katsayısı

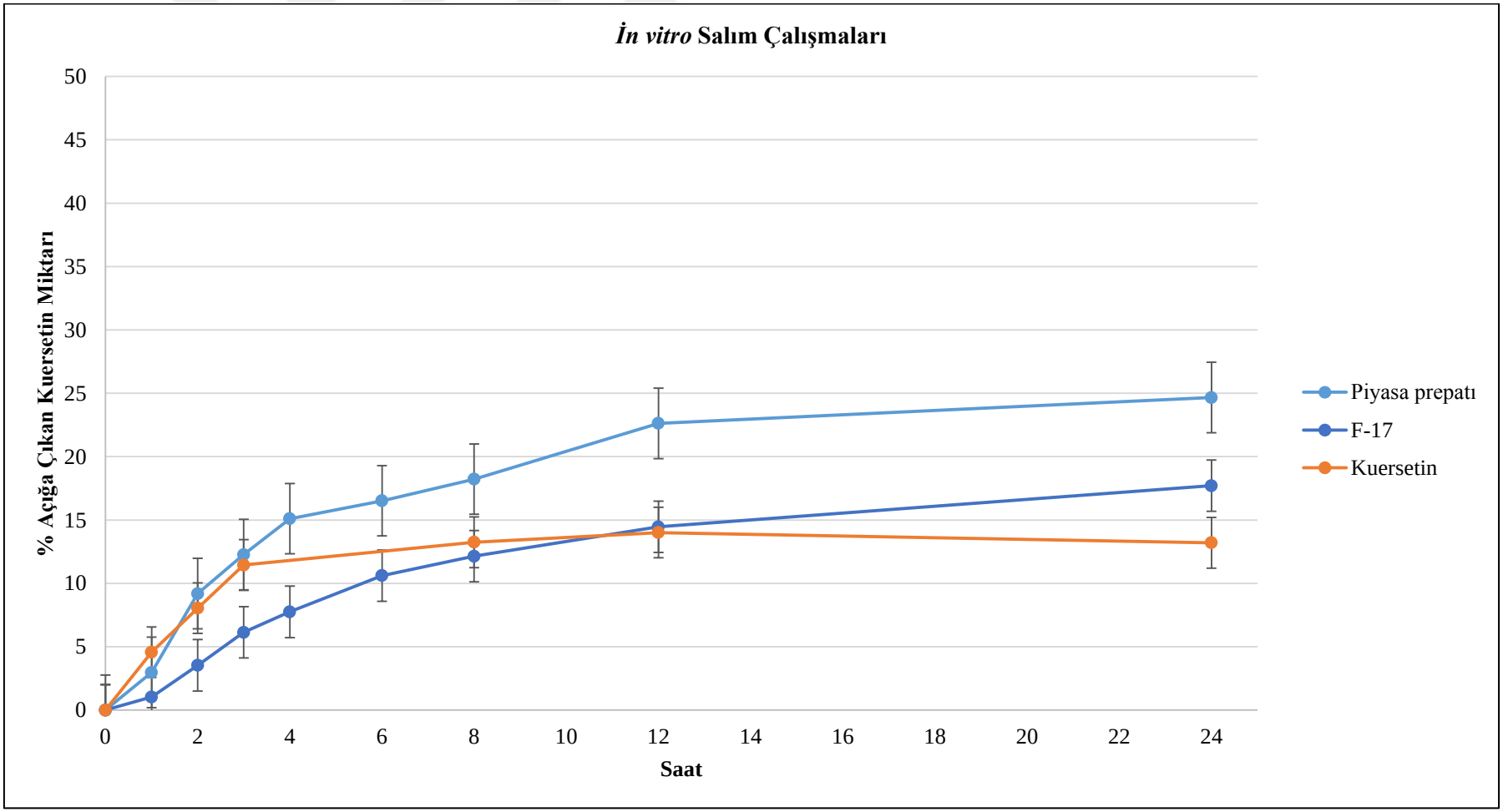
β: Şekil faktörü

n: Difüzyonal sabit katsayısı

τ_d: Etkin maddenin %63,2'sinin salınması için geçen süre (saat)

AIC: Akaike Ölçütü

MSC: Model seçim kriteri



Şekil 3.22. *İn vitro* salım çalışmaları

Çizelge 3.11. Salım kinetik değerleri

Kinetik mekanizması	Parametreler	F-17
Sıfır derece	k_r^0	0,961
	r^2	0,620
	MSC	0,503
	AIC	44,74
Birinci derece	k_r^1	0,011
	r^2	0,683
	MSC	0,697
	AIC	42,86
Higuchi	k_H	3,826
	r^2	0,967
	MSC	2,211
	AIC	29,15
Hixson-Crowell	k_{HC}	0,003
	r^2	0,663
	MSC	0,634
	AIC	43,34
Korsmayer-Peppas	k_P	1,799
	n	0,727
	r^2	0,495
	MSC	0,341
	AIC	46,01
Weibull	τ_d	0,400
	β	0,873
	r^2	0,727
	MSC	0,722
	AIC	42,53

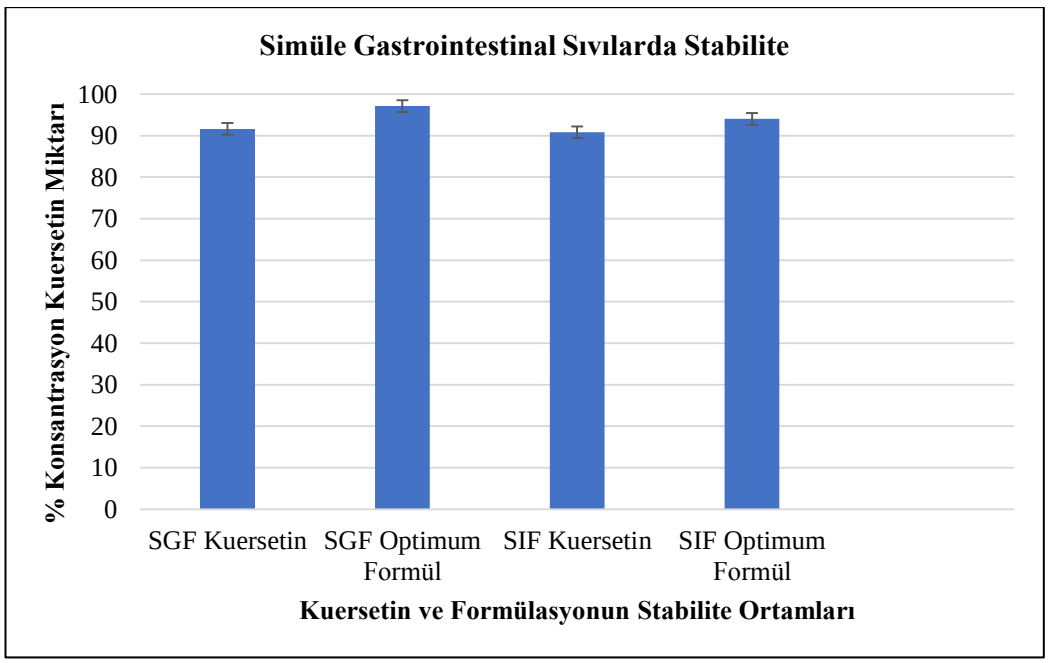
3.8. Optimum Formülasyona ait Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular

3.8.1. Optimum Formülasyona ait Simule Mide ve Bağırsak ortamlarındaki Stabilitelerine ait Bulgular

F-17 için yapılan simule gastrik sıvılar için çalışmalar Bölüm 2.13.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar saf kuersetinle karşılaştırmalı olarak Şekil 3.23'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 3.12'de ifade edilmiştir.

Çizelge 3.12. Simule Gastrointestinal Sıvılardaki Bozunmadan Kalan Kuersetin Konsantrasyonları

Simule GI ortam/Etkin madde ve Formül (F-17)	Ortamda Bozunmadan Kalan % Kuersetin Derişimi
SGF /Kuersetin	91,61
SGF /Optimum Formül	97,12
SIF/ Kuersetin	90,82
SIF/ Optimum Formül	94,03



Şekil 3.23. Simule Gastrointestinal Sıvılarda Bozunmadan Kalan % Kuersetin Miktarı

3.8.2. Optimum Formülasyona ait Buzdolabı ve Oda Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular

F-17 için yapılan buzdolabı ve oda şartları stabilite çalışmaları kapsamında enkapsülasyon etkinliği (%), partikül büyüklüğü değeri, partikül büyüklük dağılımı değeri ve zeta potansiyel değerleri için analiz ölçümleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar Bölüm 2.13.2.'de anlatıldığı gibi analizleri tamamlanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 3.13'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. Oda ve Buzdolabı Stabilite Bulgularının Sonuçları (Ortalama±SS)

Stabilite şartları	Süre	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)	Enkapsülasyon etkinliği %
	Başlangıç	-34,1±1,17	1101±32,33	0,588±0,094	83,44±0,53
25 °C ± 2 °C % 60 BN ± % 5	**1.Ay**	-31,2±0,10	1005±49,13	0,477±0,004	66,70±0,51
5 °C ± 3 °C	**1.Ay**	-26,9±0,87	1111±23,58	0,351±0,029	64,12±0,33

3.9. Kuersetin ve Optimum Formülasyon için Antibakteriyel Çalışmalar

Kuersetin ve optimum formül için yapılan aktivite çalışmaları Bölüm 2.14.'te anlatılmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen MİK değeri sonuçları Çizelge 3.14'te gösterilmiştir. Siprofloksasine karşı kuersetinin ve optimum formülün etkinliği karşılaştırılmıştır. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri için herhangi bir aktivite farklılığı gözlenmez iken *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* bakterileri için MİK değeri yarıya düşmüştür. Bu çalışma kapsamında bakteri türleri arasında MİK değeri en fazla düşmüş olan tür *Klebsiella pneumoniae'*dir.

Kuersetinin MİK değerinin en düşük olduğu yani aktivitesinin en yüksek olduğu bakteri türü *Staphylococcus aureus* iken en yüksek MİK değerlerinin olduğu bakteri türleri *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* türleridir.

Klebsiella pneumoniae için MİK değeri 4 kat oranında azalmış olup optimum formülasyonun en etkili olduğu sonucuna varılan bakteri türü olmuştur. Optimum formülasyonun MİK değerinin en düşük olduğu bakteri türleri ise *Staphylococcus aureus ve Enterococcus faecalis* iken MİK değerinin en yüksek olduğu bakteri türü ise *Pseudomonas aeruginosa*'dir.

Çizelge 3.14. *İn vitro* antibakteriyel çalışmalara ait MİK değeri sonuçları

Bakteriler	**Kuersetin (µg/ml)**	**Kuersetin Fitozomu (µg/ml)**	**Siprofloksasin (µg/ml)**
***Staphylococcus aureus* ATCC 29213**	85,9	85,9	<2
***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**	171,9	85,9	2
***Escherichia coli* ATCC 25922**	343,8	171,9	<2
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	687,5	687,5	<2
***Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	687,5	171,9	<2

Saf kuersetinin test bakterileri için; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 4. dilüsyon (85,9 µg/ml), *Enterococcus faecalis'*e ATCC 29212 karşı 3. dilüsyon (171,9 µg/ml), *Escherichia coli* ATCC 259223 2. dilüsyon (343,8 µg/ml), *Klebsiella pneumoniae'*e ATCC 13883 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisine karşı 1. dilüsyonlarda (687,5 µg/ml) MİK değerleri belirlenmiştir.

Hazırlanan kuersetin formülasyonun test bakterileri için; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Enterococcus faecalis'*e ATCC 29212 karşı 4. dilüsyon (85,9 µg/ml) , *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumoniae'*e ATCC 13883 karşı 3 dilüsyon (171,9 µg/ml) ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisine karşı 1. dilüsyonlarda (687,5 µg/ml) MİK değerleri belirlenmiştir.

4. TARTIŞMA

4.1. Kuersetinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

4.1.1. Kuersetinin FTIR Analizlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmalarımız kapsamında etkin madde olarak kullanılan kuersetinin biyolojik aktivitelerinin giderek keşfedilmesi, kuersetine olan ilgiyi önemli ölçüde artırmıştır. Yapılan FTIR çalışmaları ile kuersetinin karakteristik olarak verdiği pikler belirlenmek istenmiştir. Şekil 3.1 incelendiğinde elde edilen 1161, 1198, 1239, 1507, 1607 ve 3267 cm^{-1} pikleri elde edilmiştir. Bu pikler kuersetine özgü pikler olup literatür ile eşdeğerlik göstermektedir. 1161, 1198, 1239 cm^{-1} pikleri C-O-C, C-H bağlarını karakterize etmektedir. 1507 cm^{-1} piki ise –OH grubunu temsil eder. 1607 cm^{-1} piki C=C temsil ederken, 3267 cm^{-1} piki ise kuersetinin fenolik hidroksilleri için karşılık gelmektedir (Bicchieri vd., 2013; Hanuza vd., 2017; Valencia vd., 2021; Z. Yang vd., 2010).

4.1.2. Kuersetinin UV Analizlerinin Değerlendirilmesi

Kuersetinin UV spektrum özellikleri incelendiğinde literatür ile eşdeğer pikler verdiği görülmüştür. 255 nm ve 372 nm değerlerinde literatürde absorbans verdiği görülmektedir (Buchweitz vd., 2016).

4.1.3. Kuersetinin DSC Analizlerinin Değerlendirilmesi

Kuersetinin DSC ile termogramları Şekil 3.3'te incelendiğinde 113°C'de ve 320°C'de endotermik pikler verdiği görülmüştür. 113°C'de var olan pik olası su piki iken 320°C'de olan pikin ise karakteristik erime piki olduğu literatürlerde görülmüştür. Elde edilen termogram literatür ile uyumludur (Manca vd., 2020; Tsioptsias ve Tsivintzelis, 2022).

4.1.4. Kuersetinin SEM Görüntülerinin Değerlendirimesi

Kuersetinin SEM görüntüleri Şekil 3.4'te belirtildiği gibidir. Kuersetin uzun kristal çubuklar halinde görüntülenmiştir. Bu durum literatür ile uyum göstermektedir (Lv vd., 2019).

4.1.5. Kuersetinin XRD Analizlerinin Değerlendirilmesi

Kuersetinin XRD analizleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Kuersetin için *2θ* pikleri incelendiğinde 12.49 ve 27.49 gerilim değerleri görülmüştür. Literatür verileri incelendiğinde bu gerilim değerleri eşdeğerlik göstermektedir (Huang vd., 2017).

4.2. Kuersetin Miktar Tayini Analizleri ve Analitik Validasyonlarının Değerlendirilmesi

Kuersetinin miktar tayini analiz çalışmalarında spektrofotometre kullanılmıştır. Kuersetinin çalışılacağı ortamlar için ortak maksimum absorbans verdiği değer olarak 372 nm belirlenmiştir. Kullanılan dalga boyları literatür ile eşdeğerlik göstermektedir (Bhatia vd., 2022).

Analitik validasyon çalışmaları için analizler sonucu elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılmıştır. Bu kalibrasyon grafikleri ICH Q2 R1 kılavuzuna uygunluk gösterecek şekilde validasyon işlemleri için kullanılmıştır. Analitik validasyon çalışmaları kapsamında doğrusallık ve aralığı çalışmaları, doğruluk ve geri elde çalışmaları, kesinlik çalışmaları kapsamında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları, özgünlük, tayin sınırı (LOQ) ve teşhis sınırı (LOD) parametreleri incelenerek miktar tayini çalışmalarının validasyon işlemleri tamamlanmıştır.

Farklı ortamlarda yapılan spektrofotometrik analizlerde pH 1.2, pH 6.8 ve %0.2 Tween 80 içeren pH 6,8 ortamlarının kalibrasyon denklemleri incelendiğinde elde edilen r^2 sonuçları sırasıyla 0,998, 0,9995 ve 0,9996 olduğu görülmüştür (Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). r^2 değeri yani determinasyon katsayısı için 1' e yaklaşık olması bu denklemlerin doğrusal olduğunu ifade etmektedir. Sonuçlar için güvenilir olduğunu gösterir (International Center of Harmonization, 1994).

Doğrusallık ve aralığı çalışmaları kapsamında yapılan çalışmalarda kuersetin için elde edilen veriler Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da gösterilmiştir. r^2 değeri 1'e yakındır. Ayrıca doğrusallık istatikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir ve literatür ile uyumludur.

Doğruluk ve geri eldesi çalışmaları kapsamında değerlendirilmek amacıyla yapılan çalışmalar Bölüm 2.6'da anlatıldığı gibi düşük orta ve yüksek konsantrasyonlar için analizleri gerçekleştirilmiştir. pH 6,8 ve %0.2 Tween 80 içeren pH 6,8 ortamları için sırasıyla düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar 8,16,24 µg/ml ve 4,12,20 µg/ml'dir. Hesaplanan doğruluk çalışmaları kapsamında BSS değeri %2'yi aşmadığı için doğruluk kabul sınırları içindedir (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3).

Kesinlik çalışmaları kapsamında yapılan tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik değerleri Bölüm 2.6'da anlatıldığı şekli ile hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında %0.2 Tween 80 içeren pH 6,8 ve pH 6,8 ortamları için de 6'şar ölçüm alınmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerleri için %BSS değerleri 2'nin altında bulunduğu için kabul edilir sınırlar dahilindedir (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5). Ara kesinlik tayin çalışmaları Bölüm 2.6'da anlatıldığı şekli ile gerçekleştirilen 2 günlük analizlerde %0.2'lik Tween 80'li pH 6,8 ve pH 6,8 ortamları için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerleri için elde edilmiş olan %BSS değerleri 2'nin altında bulunduğu için kabul edilir sınırlar dahilindedir (Çizelge 3.6).

Özgünlük çalışmaları kapsamında yapılan analizlerde fosfotidilkolin ve kuersetin aynı nm değerinde absorbans vermemiştir. Bu durum girişim olmadığını göstermektedir ve maddelerin kendi aralarında seçici özellikte olduğu göstermektedir.

Kuersetin için yapılan farklı ortamların teşhis sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) çalışmaları kapsamında (Çizelge 3.7) kullanılan konsantrasyon değerleri en düşük konsantrasyon değerinin altında kalmış olup kuersetinin tayin edilebilecek sınırlar içinde çalışıldığının göstermiştir.

Kuersetin için gerçekleştirilen miktar tayini ve analitik validasyon çalışmaları kapsamında tüm yapılan çalışmaların uygun olduğu belirlenmiştir. Spektrofotometrik olarak yapılan miktar tayini çalışmalarının kuersetinin kesin ve doğru şekilde tayin edilmesi için kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

4.3. Formülasyon Çalışmaları Kapsamında Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

Kuersetin fitozomların temel olarak 3 hazırlama yöntemi bulunmaktadır. Bu hazırlama yöntemlerinden çalışmalarımızda kullanılan ince film hazırlama/çözücü uzaklaştırma yönteminin tercih edilmesinin nedeni diğer iki yöntem olan liyofilizasyon kurutma ve anti çözücü ilave yöntemlerinin proses validasyonlarının kompleks olması, proses sürelerinin uzunluğu ve sarf malzemelerinin değişkenlik göstermesidir. Bu nedenlerden dolayı ince film oluşturma/çözücü uzaklaştırma yöntemi avantajlı bir üretim metotu olarak tercih edilmiştir. Ancak bu yöntemin çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar fazla solvent kullanımı ve uzun süren reaksiyon süreleridir.

Kuersetin ve fosfotidilkolin için çözünme işlemleri literatürlerde farklı oranlarda ve farklı çözücü tiplerinde hazırlanmıştır. Bu çözücüler arasından için en çok tercih edilen olanlar kullanılmıştır.

Formülasyon parametrelerinden etkin madde:fosfolipit oranı literatürlerde genel olarak 1:1-1:3 aralığında verilmektedir. Sıcaklıklar ise genel olarak 30-60 °C aralığında verilmiştir. Süreler değişkenlik göstermektedir. Fitozom formülasyonları için elde edilen sonuçların etkin madde:fosfolipit oranı incelendiğinde 1:2,25 oranı literatürlerde çalışılmamıştır. Sıcaklık için ise 50 °C üzerine çıkılmamıştır. Çünkü metanolün kaynama noktası 56 °C olmasından kaynaklı olarak reaksiyon işlemi esnasında kaynanaması gerekmektedir. Reaksiyon süresinin elde edilen veriler sonucunda karar verilmiş olup literatür ile uyum göstermektedir.

Formülasyon çalışmaları kapsamında yapılan elde edilen sonuçlar Çizelge 2.2'den elde edilen veriler kullanılarak yorumlanmıştır. Çünkü Çizelge 2.1'deki formüllerin enkapsülasyon etkinliğinin % 40'ın altında olması nedeniyle ön çalışmalar olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 2.2'de gösterildiği gibi optimum adayı formülasyonların belirlenmesinde etkili olan 5 parametre (partikül boyutu, zeta potansiyeli, poli dispersitesite indeksi enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* salım değeri sonucuna göre F-9, F-17 ve F-19 kodlu formülasyonlarla çalışılmaya devam edilmiştir. Bu üç formülasyondan en iyi sonuç veren F-17 kodlu formülasyonun tercih edilme nedeni *in vitro* salım değerinin diğerlerine göre daha yüksek sonuç vermesidir.

Literatür verileri incelendiğinde, fitozom formülasyonlarına ilave edilen yüzey aktif maddelerinin (kolesterol gibi) ilavesi ve formülasyonlara uygulanan sonikasyon işlemlerine bağlı olarak oluşturulan partiküllerin büyüklükleri ve dağılımları, enkapsülasyon etkinlikleri farklılıklar göstermesine rağmen benzer sonuçlar da içermektedir. Bunun nedeni olarak yapının kompleksleşme esnasında oluşan yeni bağlara ve fiziksel yöntemlere bağlı olduğu ile ilgili olarak ilişkilendirilmiştir.

4.4. Optimum Formülasyon Kapsamında Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

4.4.1. Optimum Formül için Çözünürlük Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmalarımız kapsamında kuersetin için 25°C ve 37°C için pH 1,2 ve pH 6,8 değerlendirildiğinde 25°C için çözünürlük değerlerinin 37°C'ye oranla daha düşük olduğunu göstermektedir (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12). Ayrıca saf kuersetin için de pH 6,8'de 37°C 'de daha iyi çözündüğü görülmektedir. Chen ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada kuersetinin 37°C'de pH 6,5 ortamındaki çözünürlüğünü 6.6 ± 0.3 μg/mL olarak bulmuşlardır (Chen vd., 2016). Yine aynı çalışmada farklı dakikalarda alınan ölçümlerde çözünürlük değerlerinin değişik konsantrasyon değerlerinde olduğu görülmüştür. Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de görüldüğü üzere kuersetinin çözünürlüğünün en yüksek olduğu andaki zaman ile dengeye ulaştığı süre aynı değildir. Bu durum polihidroksil yapısından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Çalışılan ortamlara bağlı olarak etkin madde ve ortam arasındaki iyon dengesi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Kuersetinin zamanla denge konsantrasyona ulaştığı sonucuna varılabilir. Ayrıca degredasyona uğraması mümkün olduğundan gerekli kimyasal yöntemlere dayalı analizler de gerçekleştirilmelidir.

Ayrıca optimum formülasyon için pH 6,8 ortamındaki çözünürlük çalışması değerlendirildiğinde 100 ml için çözünürlüğünü yaklaşık olarak 1 mg artırmıştır (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Kimyasal ve fiziksel özellikleri kapsamında birbirine benzer kimyasal yapı gösteren apigeninin Telange ve ark.(2018) tarafından yapılan çalışmasında fitozom yapısının sudaki çözünürlük değerini artırdığı kanıtlamış olması yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir (Telange vd., 2018).

4.4.2. Optimum Formül için Partisyon Katsayısı Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Partisyon katsayısı, etkin maddelerin hücre membran geçişini belirleyen önemli parametrelerden biridir. Partisyon katsayısı ayrıca etkin maddenin çözünürlüğü ile de yakından ilişkilidir. Bunun nedeni olarak ise maddenin çözündüğü miktarı kadar hücre membranlarından geçişinin gerçekleşmesidir.

Kuersetinin biyoyararlanımı, vücut içerisindeki dağılımı ve dolayısıyla uygulama için kullanılan yoldaki çözünürlüğü ile ilgilidir. Kuersetin nispeten lipofiliktir ve suda çözünürlüğü oldukça düşüktür. Kuersetinin zayıf çözünürlüğü ve vücut sıcaklığında oluşan kristal formu biyoyararlanımını sınırlar. Kuersetinin mutlak biyoyararlanımı sıçanlarda %16'dır. Domuzlarda yapılan çalışmalar, kuersetin aglikon ile karşılaştırıldığında kuersetin glukozidin daha fazla biyoyararlanıma sahip olduğunu göstermiştir. Bazı hipotezler bu olguyu açıklığa kavuşturabilir. Öncelikle, kuersetin glukozit (0.76±0.01), daha düşük oktanol-su partisyon katsayısı değerlendirildiğinde aglikondan (1.82±0.32) daha fazla suda çözünür olduğu bulunmuştur (Kasikci ve Bagdatlioglu, 2016).

Kuersetinin ve optimum formülasyona ait partisyon katsayısı çalışmaları Bölüm 2.8 ve Bölüm 2.12.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 3.10'da gösterilmişir. Literatürlerde bu pH 6,8 ortamında yapılmış kuersetin fitozomuna ait partisyon katsayısı çalışmaları henüz bulunmamaktadır. Analiz edilen veriler kıyaslandığında kuersetin için partisyon katsayısının farklılığının analiz ölçüm yöntemi, kuersetinin başlangıç konsatrasyonu ve çalışınılan ortamın özelliği gibi faktörler olabileceği düşünülmüştür. Optimum formül değerlendirildiğinde tampon ortamında etkin maddenin çözünürlüğünü artırdığı görülmektedir. Bununla birlikte formülasyondan ortama geçen etkin madde miktarı arttıkça maddenin lipofilik yapıda olmasından kaynaklı olarak n-oktanole geçişinin difüzyon ile gerçekleştiği düşünülmüştür. Buna bağlı olarak da etkin madde n-oktanolde daha yüksek konsantrasyonda bulunmuştur.

4.4.3. Optimum Formülasyon için *İn vitro* Salım Çözünme Hızı Çalışmalarının Değerlendirmeleri

Kuersetin fitozom formülasyonları çalışmaları kapsamında F-9, F-17 ve F-19 kodlu formülasyonlar için enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutu, zeta potansiyeli ve

polidispersite indeksi verileri değerlendirilmiştir. Optimum adayı belirlemek için bu veriler ilaveten formülasyonlar için *in vitro* salım çözünme hızı deneyleri yapılmıştır. *İn vitro* salım çözünme hızı deney ortamı olarak belirlenen %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 ortamında gerçekleştrilmiştir. Kuersetinin çözünürlüğünü nispeten artırdığı için bu ortam tercih edilmiştir. Farklı literatür çalışmalarında çeşitli çözünme hızı ortamları da bulunmaktadır. Sink koşullar sağlanmıştır. Ayrıca bu ortamın tercih edilme nedeni kuersetinin en iyi emilim gösterdiği bölge olan üst ince bağırsak ortamına en yakın pH ortamına yakın bir değere sahip olmasıdır.

Kuersetinin çözünürlük probleminin olması nedeniyle farklı çözünme hızı ortamları hazırlanmıştır. Sun ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada pH 7,4: metanol (80:20, h/h) ortamı hazırlanmıştır (Sun vd., 2014). İlgili yapılan 24 saatlik çalışma sonunda kuersetin yaklaşık olarak % 20 oranında salım profili göstermiştir. Talarico ve ark. (2021) yılında yapılan bir diğer çalışmada ise su:etanol (65:35, h/h) ortamı hazırlanmıştır (Talarico vd., 2021). Bu çalışmada ise kuersetin yaklaşık olarak 24 saat sonunda yaklaşık %30 salım profili göstermiştir. Elde edilen veriler ile kıyaslandığında kuersetin yakın salım profili sergilemektedir (piyasa ürünü, kuersetin ve F-17).

Elde edilen sonuçlar Şekil 3.22'de gösterilmiştir. Elde edilen çözünme hız profilleri incelendiğinde kuersetinin ve keursetin komleks piyasa preparatının başlangıçta hızlı salım profili sergilediği gözlenmektedir (burst effect).

24 saatlik salım profilleri incelendiğinde başlangıçta tüm formülasyonlar yakın salım profili sergilemektedir. 12. ve 24. Saatteki salım profillerinde bir değişiklik olmadığı görülmektedir (saf kuersetin hariç). 24 saatin sonunda en yüksek salım değerine ulaşan F-17 kodlu formülasyon olurken kuersetinin salımı % 17,71 olarak belirlenmiştir. En düşük salım profili sergileyen F-9 kodlu formülasyon ise %10,47 oranında kuersetini salmıştır (Şekil 3.14). Bu iki formülasyon arasında farkın nedenleri fosfolipit oranı ve partikül büyüklüğü olarak değerlendirilebilir. Formülasyonlar için salım mekanizmaları fitozom kompleks yapıları için yüzeyden olmak üzere difüzyon, erozyon ve matriks yapısından degredasyon olarak değerlendirilmiştir (Hendawy vd., 2023).

4.4.4. Optimum Formülasyon için Salım Kinetikleri Değerlendirmeleri

Matematiksel modeller, ilaçların formülasyonlardan salım kinetiğini tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu modeller, salım mekanizması hakkında fikir verebilir ve ilacın zaman içindeki salım davranışını tahmin etmeye yardımcı olabilir. Simüle edilmiş gastrointestinal ortamda fitozomların salım mekanizmasını ve kinetiğini tahmin etmek için çeşitli teorik matematiksel modeller kullanılmıştır. Bu modeller arasında Sıfır derece, Birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Korsmeyer-Peppas'ı gibi modeller içermektedir. Hangi modelin deneysel verilere en iyi uyumu sağladığını belirlemek için determinasyon katsayısı (r^2) kullanılmıştır. r^2 değerinin 0,800 veya daha yüksek olması uygun bir uyum olarak kabul edilirken, r^2 değerinin 0,950 veya daha yüksek olması en iyi uyum olarak kabul edilmiştir. r^2 değerinin 1.000'e yakın olması ideal uyumu göstermiştir (Fathi vd., 2023). AIC değeri için en düşük olan ve MSC değeri için 2-3 aralığında olması formülasyon için uygun kinetik modelinin seçilmesinde etkili olmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.11'de gösterilmiştir. Microsoft DDSolver programı ile sonuçlar analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde Sıfır derece, Birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas ve Weibull kinetikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunun değerlendirilmesinde kullanılan parametreler ise determinasyon katsayısı, Akaike Ölçütü (AIC), Model seçim kriteri (MSC) ve hız sabiti kabul edilmiştir. Bu parametrelerin tercih edilmesinde ilgili literatür çalışmaları kabul edilmiştir (Yilmaz Usta vd., 2018; Y. Zhang vd., 2010).

Çizelge 3.11'de belirtilen sonuçlara göre analizleri yapılan kinetikler arasında belirtilen parametreler değerlendirildiğinde optimum formülasyona ait en iyi uyum sağlayan salım kinetiğinin Higuchi kinetiği olduğu görülmektedir. Diğer salım kinetikleri profilleri ile karşılaştırıldığında en yüksek hız sabitinin (3,826 mg/saat), determinasyon katsayısı için 1'e en yakın olanın (0,967), en düşük AIC değerinin (29,15) ve MSC değerinin 2-3 aralığında olması Higuchi kinetiğine uygun olmasını sağlamıştır. Elde edilen veriler literatür ile benzerlik göstermektedir (Rosita vd., 2022).

4.4.5. Optimum Formülasyon için TEM Görüntülemelerinin Değerlendirilmesi

Fitozomlar hem TEM hem de SEM kullanılarak görselleştirilebilir. F-17 formülünün TEM görüntüsü, agregasyon belirtisi göstermeyen küresel, pürüzlü yüzey vezikülleri

sergilemiştir. Elde edilen TEM görüntüsünde (Şekil 3.21) fosfolipit tabakasının kapsül içindeki dağıldığının göstergesi olan bir sonuç elde edilmiştir (P. M. Patel vd., 2023).

Kuersetinin ince çubuk halinde olan görüntüsüne (Şekil 3.4) göre fitozom yapısı kompleks halinde olduğunda küresel yapının oluşması formülasyonun başarılı şekilde hazırlandığının göstergesidir.

Elde edilen görüntülerin partikül boyutları ölçümlerinde ise dinamik ışık saçılımı yöntemi ile yapılan ölçümlerle karşılaştırıldığında partikül boyutlarının homojen bir dağılım olmadığını göstermiştir. Bazı partiküller belirlenen partikül boyutlarında iken bazıları ölçülen partikül büyüklüğünden küçük bulunmuştur.

Literatürler verilerinde farklı partikül boyutlarında fitozomlar elde edildiği görülmektedir. Ancak boyut farklılıklarına rağmen benzer küresel yapı ve görüntüler elde edilmiştir (Abd El-Fattah vd., 2017a; Kumar vd., 2022; Tripathy vd., 2011).

4.4.6. Optimum Formülasyon için DSC Analizinin Değerlendirilmesi

DSC çalışmaları formülasyona giren etkin madde ve yardımcı maddelerin arasındaki girişim özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla etkileşimleri olası etkileşimleri incelemek için tercih edilmektedir (Cheng vd., 2017).

Fitozomların erime noktası, fitokonstitüentler ve fosfolipitinkinden önemli ölçüde farklılık gösterir; bunun başlıca nedeni bileşenler arasında meydana gelen kimyasal etkileşimlerdir. Bu kimyasal bağlara örnek olarak Van der Walls bağları ve hidrojen bağları örnek verilebilinir (Babazadeh vd., 2017). Kuersetin ve fosfatidilkolin, kuersetinin -OH grubu ile fosfatidilkolinin polar kısmı arasındaki hidrojen bağı ile etkileşime girer. Bu etkileşim, fosfatidilkolinin uzun hidrokarbon kuyruğunun serbestçe dönmesini ve fosfatidilkolinin polar başını sarmasını sağlar. Kuersetin, fitozomun yüzeyinde ve matriksinin içinde moleküler olarak dağılmış ve kristal yapısını kaybetmesine neden olur (Rasaie vd., 2014). Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen kuersetin fitozom DSC termogramları Şekil 3.17'de gösterildiği gibidir. Şekil 3.17'de görüldüğü üzere kuersetin fitozom için fiziksel karışım haliyle kıyaslandığında amorf bir yapı oluşturarak fosfotidilkolin için gelen 149,89 °C'deki termogram pikinin görülmediği gözlenmiştir. Zhang ve ark. (2016) yapılan çalışmalarda elde edilen kuersetin, fosfotidilkolin, fiziksel

karışım ve formülasyona ait DSC termogram pikleri benzerlik göstermektedir (K. Zhang vd., 2016). Ayrıca kuersetin ve fosfotidilkolin arasında herhangi bir benzer erime piklerin görüldüğü termogram pikinin olmaması geçimsizlik olmadığı göstermektedir.

4.4.7. Optimum Formülasyon için FTIR Analizinin Değerlendirilmesi

Fitozom komplekslerinin oluşumu FTIR spektroskopisi kullanılarak kanıtlanabilir. Fitozom kompleksinin spektrumunun fitoaktif bileşiğin spektrumu ile karşılaştırılması ve fitokonstitüentlerin fosfolipitlerle fiziksel karışımları FTIR tekniği ile gerçekleştirilebilir (Ochi vd., 2016).

Fitozom komplekslerinde fitokonstitüentlerin serbest -OH grupları fosfolipidin kolin kısmı ile etkileşime girer. Oluşan geniş pik, serbest -OH grubu piklerindeki değişiklikleri gösterir. FTIR spektroskopisi, fitozom komplekslerinin stabilitesini kontrol etmek için yararlı bir teknik olarak da kabul edilebilir. Bu amaçla, kalan spektrumları karşılaştırarak başlangıçtaki yardımcı maddelerin spektrumunu fitozom kompleksininkinden ayırt etmek gerekir (Maryana vd., 2016).

Şekil 3.1 incelendiğinde elde edilen 1161, 1198, 1239, 1507, 1607 ve 3267 cm^{-1} pikleri kuersetin için karakteristik piklerdendir. Şekil 3.18'de fosfotidilkolinin ve Şekil 3.19'da optimum formülasyona ait FTIR pikleri incelendiğinde 1650 cm^{-1} ve 1500 cm^{-1} arasında oluşan yeni alifatik ve aromatik gruba ait bağlar olduğunu göstermektedir. Bu piklerden bazılarının kaybolmuş olması oluşan kompleks için karbonil bağlarına ait olduğu düşünülmektedir. Fosfotidilkoline ait 3008 cm^{-1} pikinin kaybolmuş olması da benzen halkasında halkası ile fosfolipit için polar hidroksil grupları arasında yeni bir etkileşim olduğu düşünülmüştür. 1200 cm^{-1} değerlerine yaklaşık gelen pikler C=N bağları oluştuğunun bu da komplekleşmenin gerçekleştiğinin göstergeleri arasındadır (Ochi vd., 2016). Ayrıca, optimum formülasyonun spektrumunda (1100 cm^{-1}) fosfolipitin -P=O gerilme pikinin (1198 cm^{-1}) kaydığı tespit edilmiştir. Bu bulgu sonucunda kuersetin ile fosfolipitler arasındaki bazı etkileşimlere işaret etmektedir (Hendawy vd., 2023).

4.4.8. Optimum Formülasyon için XRD Analizinin Değerlendirilmesi

Fitoaktif bileşiklerin kristalliği, hidrofiliklik ve hidrofobikliğinin dengelenmesine neden olan kompleksleşme nedeniyle kaybolur. DSC ve X-ışını kırınımı (XRD) analizi,

kristallik ile birlikte fosfolipitin bitkisel bileşenlerle etkileşimini doğrulamak için genellikle kullanılan ana tekniklerdendir. DSC termogramlarında ve yüksek erime noktalarında, keskin pik kristalin bitkisel aktif bileşeni temsil eder. Geniş bir pikin varlığı, saf fito-bileşen için belirgin şekilde daha düşük bir erime noktasına sahip olan fitozom yapılarına ilişkilendirilir. Geniş pik, fitoaktif bileşik kristalliğinin kaybını gösterir. XRD, her bir bileşenin, fosfolipitin, fitoaktif vezikül yapısının ve fitozom komplekslerinin kırınım açılarını (*2θ*) karşılaştırır. XRD, yardımcı maddenin kristal piklerinin kaybını belirleyebilir ve fosfolipitler içindeki etkileşimlerini gösterebilmektedir (Prabhakar Badoni, 2013).

Kuersetin ve fosfotidilkolin için gelen kırılım açıları değerleri literatür ile uyum göstermektedir (D. Singh vd., 2012). Şekil 3.20'de XRD çalışmalarının karşılaştırılmalı gösterimi bulunmaktadır. Kuersetin, fosfotidilkolin, fiziksel karışım ve optimum formülasyona ait gerilim değerleri görülmektedir. Fiziksel karışım ve optimum formül için karşılatırmalı sonuçlarında fosfotidilkolinin 19.60 (*2θ*) değeri için verdiği kırılım açısında formül için bir kırılım açısı vermediği görülmektedir. Bu durum amorf bir yapının oluştuğunu ve komplekleşmenin gerçekleştiğini götermektedir. Ayrıca fosfotidilkolin pikinin görülmemiş olması yüzeyde herhangi bir kırılım açısı oluşmamasına bağlı olarak yüzeyde tutunmadığının da göstergesidir. Formül için görülen kuersetin piklerinin yüzeyde tutunan kuersetinlerin olduğu ya da ortamda serbest halde bulunan kuersetin olabileceğini göstermektedir (Kar vd., 2023). Bu durum literatür ile eşdeğerlik göstermektedir.

4.4.9. Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.4.9.1. Optimum Formüle ait Simule Mide ve Simüle Bağırsak Ortamlarındaki Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi

Kuersetinin ve kuersetin yüklü ilaç taşıyıcı sistemlerin oral olarak uygulanmak istenildiğinde gastrointestinal yolakta farklı bölgelerinden geçmesine bağlı olarak çeşitli enzimatik ve farklı pH aralıklarına maruz kalmaktadır. Bu durum için ise hem kuersetin hem de kuersetin yüklü taşıyıcı sistemleri stabilite ve degredasyon problemleri görülmektedir (Chavoshpour-Natanzi ve Sahihi, 2019). Buna bağlı olarak çalışmalarımızda gastrointestinal sistemi taklit etmesi amacıyla farklı pH ve enzim ortamları hazırlanarak kuersetinin ve kuersetin fitozomlarının gastrointestinal sistem içerisindeki stabilitesi *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Kuersetin ve fitozom formülasyonunun SGF ortamı için yapılan çalışmasında için midede kalma süresini taklit etmek amacı ile 2 saatlik deney süresi

sonunda elde edilen veriler sonunda kuersetinin bu ortamda stabilitesinin %91,61 olarak belirlenmiştir. Formülasyonun ise bu ortamdaki stabilitesi %97,12 olarak belirlenmiştir. Bu durum fitozom formülasyonlarının kuersetini SGF ortamından önemli ölçüde koruduğunu göstermektedir. Fitozom yapısının enzim ve asidik pH'ya bağlı degredasyona karşı önemli bir bariyer görevi gösterdiği söylenebilir.

SIF ortamı için gastrointesitinal sistemdeki ortamındaki kalış süresini taklit etmek için 6 saatlik deney süresi sonucunda elde edilen veriler SGF ortamı ile benzerlik göstermektedir. Elde edilen veriler incelendiğinde kuersetinin SIF ortamında %90,82 olarak stabil kaldığı, fitozom formülasyonunun ise %94,03 oranında stabil kaldığı tespit edilmiştir. Bu durumda formülasyon etkin maddeyi intestinal ortamından korumuştur. Ancak bu koruma oranı mide ortamındaki kadar yüksek değildir. Bunun temel nedenleri arasında kalış süresi ve kuersetinin ortamlardaki çözünürlüğünün ve denge anındaki konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda simüle edilmiş bağırsak sıvısı sindiriminin son aşamasında, salınan kuersetin miktarı azalmıştır. Bu, Y. Zou ve ark.(2021) tarafından κ-karragenan ile kaplanmış kuersetin yüklü zein/kazein nanopartiküllerinin simüle *in vitro* sindirimi çalışmasında elde edilen bulgularla tutarlıdır (Y. Zou vd., 2021).

Gerçek değerlendirme yapabilmek için *in vivo* çalışmalar ile potansiyel olarak ilişkili metabolitleri ve kuersetin enkapsülasyonunun metabolik yollarını tartışmak önemlidir. *İn vivo* olarak enzimlere ve pH değişimlerine maruz kalma, potansiyel olarak kuersetinin oksidasyonuna ve bozunmasına neden olarak stabilitesini ve biyoyararlanımını etkileyebilir (Liu vd., 2024).

4.4.9.2. Oda Sıcaklığı ve Buzdolabı Ortamındaki Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Optimum formülasyon olarak belirlenen F-17 kodlu formulasyonun 1 aylık stabilite değerleri Çizelge 3.13'te gösterilmiştir. F-17 kodlu formülasyon buzdolabı ve oda şartları altında 1 aylık sonuçları değerlendirilmiştir. Zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü, PDI ve enkapsülasyon etkinliği değerleri incelendiğinde buzdolabı şartlarında zeta potansiyeli ve partikül boyutu artarken, PDI değeri ve enkapsülasyon etkinliği azalmıştır. Ancak partikül boyutundaki artma oranı oldukça azdır. Partiküllerde meydana gelen bu değişim vezikül yapıları için olağan bir durum olduğu düşünülmüştür. Enkapsülasyon etkinliğinin yaklaşık % 20 oranında düşmüş olması ise etkin maddenin saklama koşullarına uygun olmadığını

görülmüştür. Bunun için formülasyona çeşitli kaplama materyali uygulanabilir ya da üretim tekniği değiştirilip farklı maddeler kullanılarak formülasyon hazırlanabilir.

Oda şartlarındaki stabilite koşullarında ise partikül boyutu, PDI değeri ve enkapsülasyon etkinliği azalırken, zeta potansiyel değeri yükselmiştir. Enkapsülasyon etkinğinin buzdolabı şartlarına göre daha az düşüş olmuştur. Bunun sonucunda oda şartlarında buzdolabına oranla daha iyi saklama koşullarının olabileceği yorumlanmıştır. Ancak parametreler arasında tam korelasyon bulunmamaktadır.

4.5. Kuersetin ve Optimum Formülasyon için Antibakteriyel Çalışmalar

Çalışmalarımızda kuersetinin ve oluşturulan kuersetin fitozom yapılarının antibakteriyel MİK çalışmaları yapılmış ve Çizelge 3.14'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kuersetin için farklı MİK değerleri literatürlerde karşılaşılmaktadır. Bunun sebebi olarak kuersetinin farklı saflıklarda kullanılması ve farklı çözücülerde çözünmesi olarak değerlendirilmiştir. Bu duruma ilave olarak MİK değerlerindeki değişkenliklerin seyreltmelerde kullanılan metotların farklı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca bakteri türlerinin farklı kaynaklardan elde edilmesi ve farklı suş tiplerine sahip olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Hazırlama yöntemleri kullanılırken referans kabul edilen kılavuzlardaki metotların çalışmaya özgü değişiklik göstermesi yine MİK değerlerinde farklılıkların oluşmasına neden olabilmektedir.

Çizelge 3.14'te görüldüğü üzere yapılan çalışmalarda kuersetinin Gram pozitif olan *Staphylococcus aureus* (85,9 µg/ml) ve *Enterococcus faecalis*'in (85,9 µg/ml) MİK değerlerinin, diğer Gram negatif olan *Escherichia coli* (171,9 µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (687,5 µg/ml) ve *Klebsiella pneumoniae'ye* (171,9 µg/ml) göre daha düşüktür. Bu durum literatür verileri ile uygunluk göstermektedir (Majumdar ve Mandal, 2024). Ayrıca Majumdar ve Mandal (2024) yapılan çalışmalarda kuersetin için bazı MİK değerleri belirlenmiştir. Staphylococcus aureus için MİK 150 µg/ml, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli için* 300 µg/ml bulunmuştur (Majumdar ve Mandal, 2024). Verimizle karşılaştırıldığında farklı olmasının nedeninin ilgili çalışmada kuersetini etanol ile çözündürülürken bizim çalışmamızda DMSO ile çözündürülmüş olmasıdır. Çünkü kuersetinin bu iki solvandaki çözünürlükleri farklı olmasına bağlı olarak konsantrasyon değerlerinin değişmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Literatürde *Klebsiella pneumoniae* için MİK değeri 1024 µg/ml üzerinde bulunmuştur (Z. Wang vd., 2021). Elde ettiğimiz sonuçlara göre bulunan MİK değerinin üzerindedir. Ayrıca bir başka çalışmada *Klebsiella pneumoniae* için bulunan MİK değeri için 128 µg/ml olması elde edilen MİK değerinin bu aralıkta yer aldığını ve literatürde var olan aralıkta olduğunu göstermektedir (Pal ve Tripathi, 2020). Ayrıca *Klebsiella pneumoniae* Gram negatif bir tür olup tedavi seçenekleri zordur (Aydemir vd., 2023). Kuersetin fitozomunun MİK değerini 4 kat oranında düşürmesi taşıyıcı sistem olarak kullanılan fitozom yapısının avantajı olarak görülmektedir.

Literatürlelerde flavonoit yapılarının sitoplazmik membranların işlevini engellediğine yönelik çalışmalar mevcuttur. Mirzoeva ve arkadaşları (1997) bunu desteklemiş ve kuersetinin bakterilerde membran geçirgenliğini artırdığını ve membran bütünlüğünün kaybolmasına yol açtığını keşfetmiştir. Son zamanlarda, araştırmacılar flavonoitlerin peptidoglikan sentezinin ilk adımını katalize eden Murein A enzimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Herdiyati vd., 2020). Bir flavanoid yapısına sahip olan kuersetinin de çoğunlukla biyofilm oluşumunu ya da hücre duvarı ve hücre zarı bütünlüğünü bozarak antibakteriyel aktivite gösterdiği çalışmalarda yer almaktadır. Bununla birlikte, çok az sayıda çalışma giraz, Topo-IV ve NorA enzimlerinin kuersetin ve glikozit türevlerinin sekonder hedefleri olarak tanımlamıştır (Pal ve Tripathi, 2020). Bu durum fitozom yapıları için bu çalışmaya katkıda bulunmuştur. Fitozom yapısının hücre zarına benzer yapısı sayesinde Gram negatif bakterilerdeki lipit tabakadaki peptidoglikan yapısının inceliğine bağlı olarak geçişi artırması nedeniyle daha etkili olduğu düşünülmektedir. Fitozom yapısının ayrıca çözünürlük özelliklerini iyileştirip, kuersetini diğer dış yapısal degredasyonlardan koruyabilmesi özelliklerinden kaynaklı olarak avantajlı bir taşıyıcı sistem olduğu düşünülebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kuersetin çeşitli farmakolojik aktiviteleri kanıtlanmış fito-etkili bir bileşiktir. Ancak çözünürlüğünün oldukça düşük olması ve GİS içerisinde emiliminin zayıf olmasından kaynaklı olarak biyoyararlanımı zayıftır. Kuersetin fitozom yapıları oluşturularak, kuersetinin çözünürlüğünü artırmak, *in vitro* koşullarda gastrointestinal sistemi taklit edilerek farklı pH ortamlarındaki stabilitesini tayin etmek ve kuersetin fitozomunun antibakteriyel aktivitesini kuersetine karşı karşılaştırmalı olarak değerlendirmek tezimizin temel amaçları arasında bulunmaktadır.

- ✓ Kuersetinin miktar tayin çalışmaları pH 6,8 ve %0,2 Tween 80 içeren pH 6,8 tampon ortamında spektrofotometrik yöntemle hassas ve güvenli bir şekilde geliştirilmiştir. Miktar tayini yöntemleri analitik validasyon parametreleri için etkin olarak tamamlanmıştır.

- ✓ İnce film oluşturma/ çözücü uçurma yöntemleri kullanılarak uygun partikül boyutu ve partikül büyüklüğünün dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğine sahip kuersetin fitozom formülasyonları başarı ile oluşturulmuştur. Elde edilen fitozom yapılarının karakterizasyon işlemlerinin başarı ile tamamlanmıştır.

- ✓ Optimum adayı 3 formülasyon arasından en yüksek *in vitro* salım değerine sahip olan formülasyon olan F-17 kodlu formülasyon optimum formül olarak belirlenmiştir.

- ✓ F-17 kodlu formülasyonun karakterizasyon işlemlerinde TEM, XRD, FTIR, DSC kullanılmıştır.

- ✓ TEM görüntülerinde fitozom yapılarının küresel olarak oluştuğu gözlenmiştir.

- ✓ Fitozom formülasyonun Higuchi salım kinetiğine uygun olduğu görülmektedir

- ✓ Fitozom formülasyonu, kuersetinin 37 °C'deki pH 1,2 ve pH 6,8 çözünürlüğünü ve partisyon katsayısını artırmıştır.

- ✓ Simule mide ve bağırsak ortamlarında fitozom formülasyonun, kuersetinin stabilitesini artırdığı görülmektedir.

- ✓ Buzdolabı ve oda koşulları stabiliteleri incelendiğinde ise 1 ay boyunca oda koşullarındaki stabilitesinin daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

- ✓ Kuersetin ve kuersetin fitozom yapılarının 5 farklı bakteri türündeki antibakteriyel MİK değerleri kıyaslandığında, fitozom yapısının en fazla *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı anlamlı bir etki oluşturduğu görülmüştür. *Enterococcus facealis* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı da etkisinin olabileceği söylenebilir.

- ✓ *Staphylococcus aureus ve Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı formülasyon ile saf kuersetinle karşılaştırıldığında bir değişiklik saptanmamıştır.

Sonuçta kuersetin için hazırlanan fitozom formülasyonları lipit taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadır. Hazırlama yönteminin kolaylığı ve verimliliği göz önüne alındığında kuersetin için fitozom yapıları avantajlıdır. Ancak kuersetinin çözünürlüğünün sorunlu olması, stabilite problemlerinin (ışık, sıcaklık ve neme karşı) bulunması nedeniyle formülasyon haline getirmekte çok büyük sorunlar yaşanabilir. Tez çalışmalarımız kapsamında çalışmalar boyunca görüş ve öneriler ek olarak gerçekleştirilmek istenen çalışmalar göz önünde bulunduğunda;

- ✓ Kuersetin fitozom formülasyonları için farklı üretim tekniklerinin karakterizasyon üzerine olan etkisi değerlendirilmelidir.

- ✓ Farklı lipit taşıyıcı sistemlerin kuersetinin fizikokimyasal özellikleri için değerlendirmeler yapılmalıdır.

- ✓ Kuersetinin antibakteriyel etkisinin çalışılan bakteriler haricindeki MİK değeri çalışmaları çeşitlendirilmelidir.

- ✓ Kuersetin fitozom yapılarının *in vivo* farmakokinetik çalışmaları değerlendirilmelidir.

Kuersetin son yıllarda giderek önemi artan bir flavonoit yapıdır. Bu tez çalışması, kuersetin fitozom yapıları hazırlanarak literatürlerde yer almayan fizikokimyasal parametrelerinin ile stabilite çalışmalarının detaylı olarak araştırılması ve antibakteriyel aktivitelerin değerlendirilmesi bakımından önemli olup literatüre değerli katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

Abd El-Fattah, A. I., Fathy, M. M., Ali, Z. Y., El-Garawany, A. E. R. A., & Mohamed, E. K. (2017a). Enhanced therapeutic benefit of quercetin-loaded phytosome nanoparticles in ovariectomized rats. *Chemico-Biological Interactions*, *271*, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.04.026

Abd El-Fattah, A. I., Fathy, M. M., Ali, Z. Y., El-Garawany, A. E. R. A., & Mohamed, E. K. (2017b). Enhanced therapeutic benefit of quercetin-loaded phytosome nanoparticles in ovariectomized rats. *Chemico-Biological Interactions*, *271*, 30–38. https://doi.org/10.1016/J.CBI.2017.04.026

Agarwal, G., Bisht, A., & Sharma, P. (2023). An insight into physiochemical property, bioavailability and pharmacology of Quercetin: A bioflavonoid. *The Pharma Innovation Journal*, *12*(3), 1254–1260. www.thepharmajournal.com

Aghababaei, F., & Hadidi, M. (2023). Recent Advances in Potential Health Benefits of Quercetin. *Pharmaceuticals*, *16*(7), 1–31. https://doi.org/10.3390/ph16071020

Ajazuddin, & Saraf, S. (2010). Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*, *81*(7), 680–689. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.001

Alğin Yapar, E. (2017). Herbal cosmetics and novel drug delivery systems. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, *51*(3), S152–S158. https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.3

Alhakamy, N. A., Fahmy, U. A., Badr Eldin, S. M., Ahmed, O. A. A., Aldawsari, H. M., Okbazghi, S. Z., Alfaleh, M. A., Abdulaal, W. H., Alamoudi, A. J., & Mady, F. M. (2021). *Scorpion Venom-Functionalized Quercetin Phytosomes for Breast Cancer Management: In Vitro Response Surface Optimization and Anticancer Activity against MCF-7 Cells*. https://doi.org/10.3390/polym14010093

Alharbi, W. S., Almughem, F. A., Almehmady, A. M., Jarallah, S. J., Alsharif, W. K., Alzahrani, N. M., & Alshehri, A. A. (2021). Phytosomes as an Emerging Nanotechnology Platform for the Topical Delivery of Bioactive Phytochemicals. *Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 1475*, *13*(9), 1475. https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13091475

Anju Dhiman, A. N. and S. A. (2015). Novel Herbal Drug Delivery System (NHDDS): the need of Hour. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, *51*(9), 6. https://doi.org/10.7763/IPCBEE

Ansari, P., Choudhury, S. T., Seidel, V., Rahman, A. Bin, Aziz, M. A., Richi, A. E., Rahman, A., Jafrin, U. H., Hannan, J. M. A., & Abdel-Wahab, Y. H. A. (2022). Therapeutic Potential of Quercetin in the Management of Type-2 Diabetes Mellitus. *Life*, *12*(8), 1–18. https://doi.org/10.3390/life12081146

Aydemir, Ö., Ormanoğlu, G., Ayhancı, T., Zengin, M., & Köroğlu, M. (2023). Investigation of in vitro efficacy of quercetin-meropenem combination in carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolates. *Journal of Infection in Developing Countries*, *17*(9), 1325–1329. https://doi.org/10.3855/jidc.17635

Azeem, M., Hanif, M., Mahmood, K., Ameer, N., Chughtai, F. R. S., & Abid, U. (2023). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: a review. *Polymer Bulletin*, *80*(1), 241–262. https://doi.org/10.1007/s00289-022-04091-8

Babazadeh, A., Zeinali, M., & Hamishehkar, H. (2017). Nano-Phytosome: A Developing Platform for Herbal Anti-Cancer Agents in Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, *18*(999), 1–1. https://doi.org/10.2174/1389450118666170508095250

Barani, M., Sangiovanni, E., Angarano, M., Rajizadeh, M. A., Mehrabani, M., Piazza, S., Gangadharappa, H. V., Pardakhty, A., Mehrbani, M., Dell'agli, M., & Nematollahi, M. H. (2021a). Phytosomes as innovative delivery systems for phytochemicals: A comprehensive review of literature. Içinde *International Journal of Nanomedicine* (C. 16). https://doi.org/10.2147/IJN.S318416

Barani, M., Sangiovanni, E., Angarano, M., Rajizadeh, M. A., Mehrabani, M., Piazza, S., Gangadharappa, H. V., Pardakhty, A., Mehrbani, M., Dell'agli, M., & Nematollahi, M. H. (2021b). *Phytosomes as Innovative Delivery Systems for Phytochemicals: A Comprehensive Review of Literature*. https://doi.org/10.2147/IJN.S318416

Bhatia, N. K., Raj Tomar, V., Ishika, Kishor, S., & Deep, S. (2022). Effect of pH and temperature on physicochemical properties, aggregation behaviour and degradation kinetics of quercetin and baicalein in nearly aqueous media. *Journal of Molecular Liquids*, *366*, 120236. https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2022.120236

Bicchieri, M., Monti, M., Piantanida, G., & Sodo, A. (2013). Non-destructive spectroscopic investigation on historic Yemenite scriptorial fragments: Evidence of different degradation and recipes for iron tannic inks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*(8), 2713–2721. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6681-4

Bombardelli, E., Curri, S.B., Loggia, R.D., Negro, P.D., Gariboldi, P., & Tubaro, A. . (1989). Complexes between phospholipids and vegetal derivates of biological interest. *Fitoterapia*, *60*, 1–9.

Bonifácio, B. V., da Silva, P. B., Aparecido dos Santos Ramos, M., Maria Silveira Negri, K., Maria Bauab, T., & Chorilli, M. (2013). Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. *International Journal of Nanomedicine*, *9*(1), 1–15. https://doi.org/10.2147/IJN.S52634

Buchweitz, M., Kroon, P. A., Rich, G. T., & Wilde, P. J. (2016). Quercetin solubilisation in bile salts: A comparison with sodium dodecyl sulphate. *Food Chemistry*, *211*, 356–364. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.05.034

Chacko, I. A., Ghate, V. M., Dsouza, L., & Lewis, S. A. (2020). Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *195*(June), 111262. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111262

Chandira, M., & Jayakar, B. (2010). Formulation and evaluation of herbal tablets containing Ipomoea digitata Linn. extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *3*(1), 101–110.

Chavoshpour-Natanzi, Z., & Sahihi, M. (2019). Encapsulation of quercetin-loaded β-lactoglobulin for drug delivery using modified anti-solvent method. *Food Hydrocolloids*, *96*, 493–502. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.05.051

Chen, X., Zou, L., Liu, W., & McClements, D. J. (2016). Potential of Excipient Emulsions for Improving Quercetin Bioaccessibility and Antioxidant Activity: An in Vitro Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(18), 3653–3660. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01056

Cheng, W., Li, X., Zhang, C., Chen, W., Yuan, H., & Xu, S. (2017). Preparation and in vivo-in vitro evaluation of polydatin-phospholipid complex with improved dissolution and bioavailability. *Int. J. Drug Dev. Res*, *9*(1), 39–43.

Chi, C., Zhang, C., Liu, Y., Nie, H., Zhou, J., & Ding, Y. (2020). Phytosome-nanosuspensions for silybin-phospholipid complex with increased bioavailability and hepatoprotection efficacy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *144*, 105212. https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2020.105212

Choubey, A. (2011). Phytosome - A novel approach for herbal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *2*(4), 807–815.

Choudhury, A., Singh, P. A., Bajwa, N., Dash, S., & Bisht, P. (2023). Pharmacovigilance of herbal medicines: Concerns and future prospects. *Journal of Ethnopharmacology*, *309*, 116383. https://doi.org/10.1016/J.JEP.2023.116383

Colunga Biancatelli, R. M. L., Berrill, M., Catravas, J. D., & Marik, P. E. (2020). Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, *11*(June), 1–11. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451

Cury Rodrigues, M. F., Stotzer, U. S., Domingos, M. M., Deminice, R., Shiguemoto, G. E., Tomaz, L. M., de Sousa, N. M. F., Ferreira, F. C., Leite, R. D., Selistre-de-Araújo, H. S., Jordão-Júnior, A. A., Baldissera, V., & de Andrade Perez, S. E. (2013). Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. *Clinics*, *68*(9), 1247–1254. https://doi.org/10.6061/clinics/2013(09)12

Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *26*(5), 343–356. https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.09.002

D'Andrea, G. (2015). Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, *106*, 256–271. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018

Dai, C., Sharma, G., Liu, G., Shen, J., Shao, B., & Hao, Z. (2024). Therapeutic detoxification of quercetin for aflatoxin B1-related toxicity: Roles of oxidative stress, inflammation, and metabolic enzymes. *Environmental Pollution*, *345*, 123474. https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2024.123474

de Barros, D. P. C., Santos, R., Reed, P., Fonseca, L. P., & Oliva, A. (2022). Design of Quercetin-Loaded Natural Oil-Based Nanostructured Lipid Carriers for the Treatment of Bacterial Skin Infections. *Molecules*, *27*(24). https://doi.org/10.3390/molecules27248818

De Boer, V. C. J., Dihal, A. A., Van Der Woude, H., Arts, I. C. W., Wolffram, S., Alink, G. M., Rietjens, I. M. C. M., Keijer, J., & Hollman, P. C. H. (2005). Tissue Distribution of Quercetin in Rats and Pigs. *The Journal of Nutrition*, *135*(7), 1718–1725. https://doi.org/10.1093/JN/135.7.1718

De Smet, P. A. G. M. (2004). Health risks of herbal remedies: An update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *76*(1), 1–17. https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.03.005

Deepika; Maurya, P. K. (2022). Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*, *27*, 2498. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ molecules27082498

Dhanya, R. (2022). Quercetin for managing type 2 diabetes and its complications, an insight into multitarget therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *146*, 112560. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112560

Dutt, Y., Pandey, R. P., Dutt, M., Gupta, A., Vibhuti, A., Raj, V. S., Chang, C. M., & Priyadarshini, A. (2023). Liposomes and phytosomes: Nanocarrier systems and their applications for the delivery of phytoconstituents. *Coordination Chemistry Reviews*, *491*, 215251. https://doi.org/10.1016/J.CCR.2023.215251

Fathi, F., Kouchaksaraee, R. M., Ebrahimi, S. N., Costa, A. S. G., Souto, E. B., Prior, J. A. V., Oliveira, M. B. P. P., & Alves, R. C. (2023). Enhanced-release of phenolic-enriched grape seed antioxidants through innovative cholesterol doped phytosomes. *Sustainable Materials and Technologies*, *37*, e00673. https://doi.org/10.1016/J.SUSMAT.2023.E00673

Fideles, S. O. M., de Cássia Ortiz, A., Buchaim, D. V., de Souza Bastos Mazuqueli Pereira, E., Parreira, M. J. B. M., de Oliveira Rossi, J., da Cunha, M. R., de Souza, A. T., Soares, W. C., & Buchaim, R. L. (2023). Influence of the Neuroprotective Properties of Quercetin on Regeneration and Functional Recovery of the Nervous System. *Antioxidants*, *12*(1), 149. https://doi.org/10.3390/antiox12010149

Fong, S. Y. K., Liu, M., Wei, H., Löbenberg, R., Kanfer, I., Lee, V. H. L., Amidon, G. L., & Zuo, Z. (2013). Establishing the pharmaceutical quality of Chinese herbal medicine: A provisional BCS classification. *Molecular Pharmaceutics*, *10*(5), 1623–1643. https://doi.org/10.1021/mp300502m

Gaikwad, S. S., Morade, Y. Y., Kothule, A. M., Kshirsagar, S. J., Laddha, U. D., & Salunkhe, K. S. (2023). Overview of phytosomes in treating cancer: Advancement, challenges, and future outlook. *Heliyon*, *9*(6), e16561. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16561

Goudet, C., Chi, C. W., & Tytgat, J. (2002). An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion Buthus martensi Karsch. *Toxicon*, *40*(9), 1239–1258. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00142-3

Goyal, A., Kumar, S., Nagpal, M., Singh, I., & Arora, S. (2011). Potential of novel drug delivery systems for herbal drugs. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, *45*(3), 225–235.

Guo, Y., & Bruno, R. S. (2015). Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(3), 201–210. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.008

Gupta, M., Sharma, D. N. C. V., & Chauhan, N. S. (2019). *Novel Drug Delivery Systems for Phytoconstituents*.

Hani, U., Jaswanth Gowda, B. H., Siddiqua, A., Wahab, S., Begum, Y., Sathishbabu, P., Usmani, S., & Ahmad, M. P. (2023). Herbal approach for treatment of cancer using curcumin as an anticancer agent: A review on novel drug delivery systems. *Journal of Molecular Liquids*, *390*, 123037. https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2023.123037

Hanuza, J., Godlewska, P., Kucharska, E., Ptak, M., Kopacz, M., Mączka, M., Hermanowicz, K., & Macalik, L. (2017). Molecular structure and vibrational spectra of quercetin and quercetin-5'-sulfonic acid. *Vibrational Spectroscopy*, *88*, 94–105. https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2016.11.007

Hari Priya, V. M., & Kumaran, A. (2023). Recent Trends in Phytosome Nanocarriers for Improved Bioavailability and Uptake of Herbal Drugs . *Pharmaceutical Sciences*, *29*(3), 298–319. https://doi.org/10.34172/ps.2023.6

Hashemzadeh, H., Hanafi-Bojd, M. Y., Iranshahy, M., Zarban, A., & Raissi, H. (2023). The combination of polyphenols and phospholipids as an efficient platform for delivery of natural products. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–20. https://doi.org/10.1038/s41598-023-29237-0

Hatahet, T., Morille, M., Hommoss, A., Devoisselle, J. M., Müller, R. H., & Bégu, S. (2016). Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *108*, 41–53. https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2016.08.011

Hendawy, O. M., Al-Sanea, M. M., Elbargisy, R. M., Rahman, H. U., Gomaa, H. A. M., Mohamed, A. A. B., Ibrahim, M. F., Kassem, A. M., & Elmowafy, M. (2023). Development of Olive Oil Containing Phytosomal Nanocomplex for Improving Skin Delivery of Quercetin: Formulation Design Optimization, In Vitro and Ex Vivo Appraisals. *Pharmaceutics*, *15*(4). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041124

Herdiyati, Y., Atmaja, H. E., Satari, M. H., & Kurnia, D. (2020). Potential Antibacterial Flavonoid from Buah Merah (Pandanus conodieus Lam.) Against Pathogenic Oral Bacteria of Enterococcus faecalis ATCC 29212. *The Open Dentistry Journal*, *14*(1), 433–439. https://doi.org/10.2174/1874210602014010433

Huang, J., Wang, Q., Li, T., Xia, N., & Xia, Q. (2017). Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. *Journal of Food Engineering*, *215*, 1–12. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2017.07.002

International Center of Harmonization. (1994). Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: The ICH Process. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*, *1994*(November), 447–460. https://doi.org/10.1002/9781118532331.ch23

Kandemir, K., Tomas, M., McClements, D. J., & Capanoglu, E. (2022). Recent advances on the improvement of quercetin bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, *119*, 192–200. https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.11.032

Kar, S., Das, S. S., & Singh, S. K. (2023). Quercetin-encapsulated magnetoliposomes: Fabrication, optimization, characterization, and antioxidant studies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *125*(12), 2300112. https://doi.org/10.1002/EJLT.202300112

Karataş, A., & Turhan, F. (2015). Phyto-Phospholipid Complexes as Drug Delivery System for Herbal Extracts/Molecules. *Turk J Pharm Sci*, *12*(1), 93–102.

Karpuz, M., Gunay, M. S., & Ozer, A. Y. (2020). Liposomes and phytosomes for phytoconstituents. Içinde *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents* (ss. 525–553). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819666-3.00018-3

Kasikci, M. B., & Bagdatlioglu, N. (2016). Bioavailability of quercetin. *Current Research in Nutrition and Food Science*, *4*(SpecialIssue2), 146–151. https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.20

Keranmu, A., Pan, L. Bin, Yu, H., Fu, J., Liu, Y. F., Amuti, S., Han, P., Ma, S. R., Xu, H., Zhang, Z. W., Chen, D., Yang, F. Y., Wang, M. S., Wang, Y., Xing, N. Z., & Jiang, J. D. (2021). The potential biological effects of quercetin based on pharmacokinetics and multi-targeted mechanism in vivo. *Journal of Asian Natural Products Research*, *24*(5), 403–431. https://doi.org/10.1080/10286020.2022.2045965

Khursheed, R., Singh, S. K., Wadhwa, S., Gulati, M., & Awasthi, A. (2020). Enhancing the potential preclinical and clinical benefits of quercetin through novel drug delivery systems. Içinde *Drug Discovery Today* (C. 25, Sayı 1, ss. 209–222). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.11.001

Kim, H. H. soo, & Ryu, J. (2021). Social distancing attitudes, national context, and health outcomes during the COVID-19 pandemic: Findings from a global survey. *Preventive Medicine*, *148*, 106544. https://doi.org/10.1016/J.YPMED.2021.106544

Kopka, B., Kost, B., Wrześniewska, J., Rajkowska, K., Kadłubowski, S., Kunicka-Styczyńska, A., Baryga, A., Gonciarz, W., Basko, M., & Brzeziński, M. (2023). Supramolecular poly(vinyl alcohol)-based hydrogels containing quercetin for bacterial and fungal elimination. *European Polymer Journal*, *187*, 111881. https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2023.111881

Kumar, S., Baldi, A., & Sharma, D. K. (2022). Characterization and In vitro investigation of antiscabietic effect of phytosomes assimilating quercetin and naringenin rich fraction of Pistacia integerrima galls extract against Sarcoptes scabiei. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *67*, 102851. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102851

Lenard, N., Henagan, T. M., Lan, T., Nguyen, A., & Bhattacharya, D. (2022). *molecules Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle*. https://doi.org/10.3390/molecules27082494

Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, *8*(3), 1–14. https://doi.org/10.3390/nu8030167

Lindinger-Sternart, S., Kaur, V., Widyaningsih, Y., & Patel, A. K. (2021). COVID-19 phobia across the world: Impact of resilience on COVID-19 phobia in different nations. *Counselling and Psychotherapy Research*, *21*(2), 290–302. https://doi.org/10.1002/capr.12387

Liu, J., Yu, H., Kong, J., Ge, X., Sun, Y., Mao, M., Wang, D. Y., & Wang, Y. (2024). Preparation, characterization, stability, and controlled release of chitosan-coated zein/shellac nanoparticles for the delivery of quercetin. *Food Chemistry*, *444*, 138634. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2024.138634

Lu, M., Qiu, Q., Luo, X., Liu, X., Sun, J., Wang, C., Lin, X., Deng, Y., & Song, Y. (2019). Phyto-phospholipid complexes (phytosomes): A novel strategy to improve the bioavailability of active constituents. Içinde *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (C. 14, Sayı 3, ss. 265–274). Shenyang Pharmaceutical University. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.05.011

Lv, R., Qi, L., Zou, Y., Zou, J., Luo, Z., Shao, P., & Tamer, T. M. (2019). Preparation and structural properties of amylose complexes with quercetin and their preliminary evaluation in delivery application. *International Journal of Food Properties*, *22*(1), 1445–1462. https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1651736

Madaan, K., Lather, V., & Pandita, D. (2016). Evaluation of polyamidoamine dendrimers as potential carriers for quercetin, a versatile flavonoid. *Drug Delivery*, *23*(1), 254–262. https://doi.org/10.3109/10717544.2014.910564

Majumdar, G., & Mandal, S. (2024). Evaluation of broad-spectrum antibacterial efficacy of quercetin by molecular docking, molecular dynamics simulation and in vitro studies. *Chemical Physics Impact*, *8*, 100501. https://doi.org/10.1016/J.CHPHI.2024.100501

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727–747. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727

Manca, M. L., Lai, F., Pireddu, R., Valenti, D., Schlich, M., Pini, E., Ailuno, G., Fadda, A. M., & Sinico, C. (2020). Impact of nanosizing on dermal delivery and antioxidant activity of quercetin nanocrystals. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *55*, 101482. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.101482

Maryana, W., Rachmawati, H., & Mudhakir, D. (2016). Formation of Phytosome Containing Silymarin Using Thin Layer-Hydration Technique Aimed for Oral Delivery. *Materials Today: Proceedings*, *3*(3), 855–866. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.02.019

Mohapatra, D., Agrawal, A. K., & Sahu, A. N. (2021). Exploring the potential of solid dispersion for improving solubility, dissolution & bioavailability of herbal extracts, enriched fractions, and bioactives. *Journal of Microencapsulation*, *38*(7–8), 594–612. https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1963342

Mukherjee, P. K. (2022). Evidence-Based Validation of Herbal Medicine: Translational Research on Botanicals. Içinde *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine: Translational Research on Botanicals*. https://doi.org/10.1016/C2020-0-02569-7

Mukrimaa, S. S., Nurdyansyah, Fahyuni, E. F., YULIA CITRA, A., Schulz, N. D., Taniredja, T., Faridli, E. M., & Harmianto, S. (2016). Nanocosmeceuticals: Innovation, Application, and Safety. Içinde *Jurnal Penelitian Pendidikan Guru Sekolah Dasar* (C. 6, Sayı August).

Naik, G. G., Sahu, A. N., Kaushik, V., Kaushik, A., & Sarkar, B. K. (2023). Phytopharmaceuticals and herbal drugs: prospects and safety issues in the delivery of natural products. *Phytopharmaceuticals and Herbal Drugs: Prospects and Safety Issues in the Delivery of Natural Products*, 215–248. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99125-4.00006-8

Nsairat, H., Khater, D., Odeh, F., Jaber, A. M., Al Sulaibi, M. A. M., Alshaer, W., Al Bawab, A., & Mubarak, M. S. (2023). Phytosomes: a modernistic approach to the delivery of herbal drugs. *Advanced and Modern Approaches for Drug Delivery*, 301–355. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91668-4.00029-0

Ochi, M. M., Amoabediny, G., Rezayat, S. M., Akbarzadeh, A., & Ebrahimi, B. (2016). In Vitro Co-Delivery Evaluation of Novel Pegylated Nano-Liposomal Herbal Drugs of Silibinin and Glycyrrhizic Acid (Nano-Phytosome) to Hepatocellular Carcinoma Cells Citation: Ochi MM, Amoabediny Gh, Rezayat SM, Akbarzadeh A, Ebrahimi B. In vitro co-delive. *CELL JOURNAL(Yakhteh)*, *18*(2), 135–148.

Opatha, S. A. T., Titapiwatanakun, V., & Chutoprapat, R. (2020). Transfersomes: A promising nanoencapsulation technique for transdermal drug delivery. *Pharmaceutics*, *12*(9), 1–23. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090855

Osonga, F. J., Akgul, A., Miller, R. M., Eshun, G. B., Yazgan, I., Akgul, A., & Sadik, O. A. (2019). Antimicrobial activity of a new class of phosphorylated and modified flavonoids. *ACS Omega*, *4*(7), 12865–12871. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00077

Ozgen, S., Kilinc, O. K., & Selamoglu, Z. (2016). Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review Kuersetinin Antioksidan Aktivitesi: Mekanik Bir Derleme. *Turkish Journal of Agriculture -Food Science and Technology*, *4*(412), 1134–1138. www.agrifoodscience.com,

Pal, A., & Tripathi, A. (2020). Demonstration of bactericidal and synergistic activity of quercetin with meropenem among pathogenic carbapenem resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *Microbial Pathogenesis*, *143*, 104120. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104120

Patel, P. M., Modi, C. M., Patel, H. B., Patel, U. D., Ramchandani, D. M., Patel, H. R., & Paida, B. V. (2023). Phytosome: An Emerging Technique for Improving Herbal Drug Delivery. *The Journal of Phytopharmacology*, *12*(1), 51–58. https://doi.org/10.31254/phyto.2023.12108

Patel, R. V., Mistry, B. M., Shinde, S. K., Syed, R., Singh, V., & Shin, H. S. (2018). Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. Içinde *European Journal of Medicinal Chemistry* (C. 155, ss. 889–904). Elsevier Masson SAS. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.053

Pierro, F. Di, Iqtadar, S., Khan, A., Ullah Mumtaz, S., Chaudhry, M. M., Bertuccioli, A., Derosa, G., Maffioli, P., Togni, S., Riva, A., Allegrini, P., & Khan, S. (2021). *Open-Label Clinical Trial*. https://doi.org/10.2147/IJGM.S318949

Pinheiro, R. G. R., Pinheiro, M., & Neves, A. R. (2021). Nanotechnology innovations to enhance the therapeutic efficacy of quercetin. *Nanomaterials*, *11*(10), 1–26. https://doi.org/10.3390/nano11102658

Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *306*(2), 530–536. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01006-4

Prabhakar Badoni, M. S. M. R. D. S. R. B. K. T. M. S. A. S. (2013). Baicalein-phospholipid complex: a novel drug delivery technology for phytotherapeutics. *Current Drug Discovery Technologies*, *10*(3), 224–232. https://doi.org/10.2174/1570163811310030005

Prasad, S. B., Bhatiya, S., & Singh, S. (2016). Phytosome: Phytoconstituent based lipid derived drug delivery system. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *8*(5), 664–670.

Qayyum, S., Sharma, D., Bisht, D., & Khan, A. U. (2019). Identification of factors involved in Enterococcus faecalis biofilm under quercetin stress. *Microbial Pathogenesis*, *126*, 205–211. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.11.013

Rajesh R, U., & Dhanaraj, S. (2023). A critical review on quercetin bioflavonoid and its derivatives: Scope, synthesis, and biological applications with future prospects. *Arabian Journal of Chemistry*, *16*(8), 104881. https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2023.104881

Rasaie, S., Ghanbarzadeh, S., Mohammadi, M., & Hamishehkar, H. (2014). Nano phytosomes of quercetin: A promising formulation for fortification of food products with antioxidants. *Pharmaceutical Sciences*, *20*(3), 96–101.

Riva, A., Ronchi, M., Petrangolini, G., Bosisio, S., & Allegrini, P. (2019). Improved Oral Absorption of Quercetin from Quercetin Phytosome®, a New Delivery System Based on Food Grade Lecithin. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, *44*(2), 169–177. https://doi.org/10.1007/S13318-018-0517-3

Rosita, N., Ambarwati, N., Erawati, T., & Hariyadi, D. (2022). Characterization and in vitro release of inhalation quercetin solid lipid microparticles: Effect of lipid. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, *13*(1), 11–17. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_263_21

Rothwell, J. A., Day, A. J., & Morgan, M. R. A. (2005). Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(11), 4355–4360. https://doi.org/10.1021/jf0483669

Saadat, M., Zahednezhad, F., Zakeri-Milani, P., Heidari, H. R., Shahbazi-Mojarrad, J., & Valizadeh, H. (2019). Drug targeting strategies based on charge dependent uptake of nanoparticles into cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *22*(1), 191–220. https://doi.org/10.18433/jpps30318

Saha, S., D'souza, D., & Londhe, V. Y. (2021). Exploring the concepts of various nano-formulations loaded with herbal drugs moieties against breast cancer using PRISMA analysis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *66*, 102865. https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102865

Saraf, S., Sahu, R. K., & Dave, V. (2022). *Advanced Pharmaceutical Herbal Nanoscience : Targeted Drug Delivery System Part II Edited by*.

Selvaraj, S., & Venkidasamy, B. (2024). Quercetin, a natural antioxidant compound for the treatment of oral cancer therapy. *Oral Oncology Reports*, *10*, 100247. https://doi.org/10.1016/J.OOR.2024.100247

Shabbir, U., Rubab, M., Daliri, E. B., Chelliah, R., Javed, A., & Oh, D. (2021). *The Role of Gut Microbiota*.

Shafabakhsh, R., & Asemi, Z. (2019). Quercetin: A natural compound for ovarian cancer treatment. *Journal of Ovarian Research*, *12*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s13048-019-0530-4

Sharma, A., Sabharwal, P., & Dada, R. (2021). Herbal medicine—An introduction to its history. *Herbal Medicine in Andrology*, 1–8. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815565-3.00001-1

Sharma, S. (2020). *Sustainable Agriculture Reviews* (C. 1). https://doi.org/10.1007/978-3-030-41838-0_5

Sindhumol, P. G., Thomas, M., & Mohanachandran, P. S. (2010). Phytosomes: A novel dosage form for enhancement of bioavailability of botanicals and neutraceuticals. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *2*(4), 10–14.

Singer, A., Barakat, Z., Mohapatra, S., & Mohapatra, S. S. (2019). Nanoscale Drug-Delivery Systems: In Vitro and In Vivo Characterization. *Nanocarriers for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, 395–419. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814033-8.00013-8

Singh, A., Srivastav, S., Singh, M. P., Singh, R., Kumar, P., & Kush, P. (2024). Recent advances in phytosomes for the safe management of cancer. *Phytomedicine Plus*, *4*(2), 100540. https://doi.org/10.1016/J.PHYPLU.2024.100540

Singh, D., S.M. Rawat, M., Semalty, A., & Semalty, M. (2012). Quercetin-Phospholipid Complex: An Amorphous Pharmaceutical System in Herbal Drug Delivery. *Current Drug Discovery Technologies*, *9*(1), 17–24. https://doi.org/10.2174/157016312799304507

Sohail, M., Rabbi, F., Younas, A., Hussain, A., Yu, B., Li, Y., Iqbal, S., Ullah, K. H., Qadeer, A., Aquib, M., Iqbal, H., & Xu, H. (2022). Herbal bioactive–based nano drug delivery systems. *Herbal Bioactive-Based Drug Delivery Systems: Challenges and Opportunities*, 169–193. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824385-5.00011-X

Srinivas, K., King, J. W., Howard, L. R., & Monrad, J. K. (2010). Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, *100*(2), 208–218. https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.04.001

Sun, M., Nie, S., Pan, X., Zhang, R., Fan, Z., & Wang, S. (2014). Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *113*, 15–24. https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2013.08.032

Talarico, L., Consumi, M., Leone, G., Tamasi, G., & Magnani, A. (2021). Solid lipid nanoparticles produced via a coacervation method as promising carriers for controlled release of quercetin. *Molecules*, *26*(9), 1–14. https://doi.org/10.3390/molecules26092694

Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X., & Miao, L. (2020). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *121*, 109604. https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109604

Telange, D. R., Wavare, K. D., Patil, A. T., Umekar, M. J., Anand, S., & Dave, V. S. (2018). Drug-phospholipid complex-loaded matrix film formulation for enhanced transdermal delivery of quercetin. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, *9*(2), 31–50.

Tripathy, S., Patel, D. K., Baro, L., & Nair, S. K. (2011). a Review on Phytosomes, Their Characterization, Advancement & Potential for Transdermal Application. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, *2013*(3), 147–152. http://jddtonline.info

Truzzi, F., Tibaldi, C., Zhang, Y., Dinelli, G., & Amen, E. D. (2021). *Molecular Sciences An Overview on Dietary Polyphenols and Their Biopharmaceutical Classification System (BCS)*. https://doi.org/10.3390/ijms22115514

Tsioptsias, C., & Tsivintzelis, I. (2022). On the Thermodynamic Thermal Properties of Quercetin and Similar Pharmaceuticals. *Molecules*, *27*(19). https://doi.org/10.3390/molecules27196630

USP. (2021). <1236> Solubility Measurements. *United States Pharmacopoeia*, *USP 43–NF*, 1–13.

Valencia, M. S., Franco da Silva Júnior, M., Xavier Júnior, F. H., de Oliveira Veras, B., Fernanda de Oliveira Borba, E., Gonçalves da Silva, T., Xavier, V. L., Pessoa de Souza, M., & Carneiro-da-Cunha, M. das G. (2021). Bioactivity and cytotoxicity of quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *31*, 101879. https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101879

Wadhwa, K., Kadian, V., Puri, V., Bhardwaj, B. Y., Sharma, A., Pahwa, R., Rao, R., Gupta, M., & Singh, I. (2022). New insights into quercetin nanoformulations for topical delivery. *Phytomedicine Plus*, *2*(2), 100257. https://doi.org/10.1016/J.PHYPLU.2022.100257

Waldmann, S., Almukainzi, M., Bou-Chacra, N. A., Amidon, G. L., Lee, B. J., Feng, J., Kanfer, I., Zuo, J. Z., Wei, H., Bolger, M. B., & Löbenberg, R. (2012). Provisional biopharmaceutical classification of some common herbs used in western medicine. *Molecular Pharmaceutics*, *9*(4), 815–822. https://doi.org/10.1021/mp200162b

Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(7), 829–837. https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.01.002

Wang, L., Li, B. B., Si, X., Liu, X., Deng, X., Niu, X., Jin, Y., Wang, D., & Wang, J. (2019). Quercetin protects rats from catheter-related Staphylococcus aureus infections by inhibiting coagulase activity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(7), 4808–4818. https://doi.org/10.1111/jcmm.14371

Wang, S., Yao, J., Zhou, B., Yang, J., Chaudry, M. T., Wang, M., Xiao, F., Li, Y., & Yin, W. (2018). Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro. *Journal of Food Protection*, *81*(1), 68–78. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-214

Wang, Z., Ding, Z., Li, Z., Ding, Y., Jiang, F., & Liu, J. (2021). Antioxidant and antibacterial study of 10 flavonoids revealed rutin as a potential antibiofilm agent in Klebsiella pneumoniae strains isolated from hospitalized patients. *Microbial Pathogenesis*, *159*, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105121

WHO. (1998). Regulatory situation of herbal medicines a worldwide review: The evaluation of these products and ensuring their safety and efficacy through registration and regulation present important challenges. *World Healt Organization*, 1–39. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63801/WHO_TRM_98.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Xiao, L., Luo, G., Tang, Y., & Yao, P. (2018). Quercetin and iron metabolism: What we know and what we need to know. *Food and Chemical Toxicology*, *114*(February), 190–203. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.022

Yang, D., Wang, T., Long, M., & Li, P. (2020). Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/8825387

Yang, Z., Peng, H., Wang, W., & Liu, T. (2010). Crystallization behavior of poly(ε-caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, *116*(5), 2658–2667. https://doi.org/10.1002/app

Yi Shu. (2011). Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(30), 5358–5361. https://doi.org/10.5897/ajmr11.849

Yilmaz Usta, D., Demi Rtas, Ö., ÖkÇelik, C., Uslu, A., & Teksin, Z. Ş. (2018). Evaluation of in vitro dissolution characteristics of flurbiprofen, a BCS class IIa drug. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, *43*(2), 27–34.

Zaplatic, E., Bule, M., Shah, S. Z. A., Uddin, M. S., & Niaz, K. (2019). Molecular mechanisms underlying protective role of quercetin in attenuating Alzheimer's disease. *Life Sciences*, *224*, 109–119. https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.03.055

Zhang, K., Zhang, M., Liu, Z., Zhang, Y., Gu, L., Hu, G., Chen, X., & Jia, J. (2016). Development of quercetin-phospholipid complex to improve the bioavailability and protection effects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in SD rats. *Fitoterapia*, *113*, 102–109. https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2016.07.008

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS Journal*, *12*(3), 263–271. https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1

Zhao, Y., Chen, M., Zhao, Z., & Yu, S. (2015). The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (Saccharum officinarum L.) bagasse extract against food-borne pathogens. *Food Chemistry*, *185*, 112–118. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.03.120

Zhou, Y., Qian, C., Tang, Y., Song, M., Zhang, T., Dong, G., Zheng, W., Yang, C., Zhong, C., Wang, A., Zhao, Y., & Lu, Y. (2023). Advance in the pharmacological effects of quercetin in modulating oxidative stress and inflammation related disorders. *Phytotherapy Research*, *37*(11), 4999–5016. https://doi.org/10.1002/ptr.7966

Zou, H., Ye, H., Kamaraj, R., Zhang, T., Zhang, J., & Pavek, P. (2021). A review on pharmacological activities and synergistic effect of quercetin with small molecule agents. *Phytomedicine*, *92*, 153736. https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2021.153736

Zou, Y., Qian, Y., Rong, X., Cao, K., McClements, D. J., & Hu, K. (2021). Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: Formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, *120*, 106980. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106980